

DANIELA REIS DA COSTA HERTER

Polimorfismos do gene *HLA-DRB1* associados à resposta imune humoral contra o antígeno-1 de membrana apical das variantes de *Plasmodium vivax* (VK210, VK247 e *P.vivax-like*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que vivem em área endêmica para malária e estão constantemente expostas aos males trazidos por esta doença. Pessoas que conhecem muito dos sofrimentos e perdas que o Plasmodio traz para suas vidas e pouco conhecem dos estudos que estão por traz de cada história que carregam e, mesmo assim, depositam esperanças em nós, pesquisadores, para que um dia tenham uma vida mais branda e menos dolorida.

.Agradeço a **Deus**, por me levar em seus braços nos momentos de desânimo e incertezas;

À minha mãe, **Libertina**, por seu incondicional amor, exemplo de força, sabedoria e dignidade;

Ao meu pai, **Elias**, pelo incentivo dado, desde criança, aos estudos, ensinando-me o verdadeiro valor de um homem;

Ao meu esposo, **Roger**, pela paciência e apoio dado para que eu buscasse a realização de um sonho, não deixando que a distância e o tempo fizessem com que nosso amor se esgotasse;

Aos meus irmãos, **Márcio, Eliane e Ricardo**, por serem meus melhores amigos, a quem eu posso confiar e contar a qualquer momento.

À família Lopes de Macedo, **Paulo, Paula, Beatriz e Maria Eduarda**, família que abriu não só a porta de sua casa, mas também o coração para me acolher sem restrições, não deixando a saudade abalar minha vida;

Ao meu orientador, **Profº Drº Ricardo Machado**, pela paciência e dedicação ao meu trabalho, durante todo o curso;

Ao **Profº Drº Luiz Carlos de Mattos**, por seu tempo atenciosamente dispensado a esclarecer minhas dúvidas.

À doutoranda **Luciane Storti-Melo**, pelas horas gastas ao meu lado, unicamente para retirar minhas dúvidas.

À **Luciana Moran e Valéria Fraga**, que desde o primeiro dia em que cheguei ao laboratório, não mediram esforços para me ajudar, deixando muitas vezes de lado algo de seu próprio interesse para me atender.

Enfim, aos amigos que fiz, família CIM, que tornaram o dia-a-dia do laboratório mais prazeroso, sempre os levarei em meu coração.

Com o término de meu mestrado, não conquistei apenas um pouco de conhecimento científico, conquistei amizades que ficarão para sempre em minha vida.

“Ainda que eu fale a língua dos homens e dos anjos,
se não tiver amor,
serei como o sino que ressoa ou prato que retine.

Ainda que eu tenha o dom da profecia e saiba todos os mistérios
e todo o conhecimento, e tenha uma fé capaz de mover montanhas,
se não tiver amor,
nada serei.

Ainda que eu dê aos pobres tudo o que possuo
e entregue o meu corpo para ser queimado,
se não tiver amor,
nada disso me valerá.”

Coríntios 13:1-3

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1.	Aspectos da malária.....	02
1.2.	Variantes do <i>Plasmodium vivax</i>	08
1.3.	Antígenos candidatos à vacina.....	11
1.3.1.	Proteína circunsporozoíta de superfície.....	12
1.3.2.	Proteína de ligação da Duffy.....	15
1.3.3.	Proteína de superfície do merozoíta-1.....	16
1.3.4.	Antígeno-1 de membrana apical.....	18
1.4.	Complexo principal de histocompatibilidade	27
1.4.1.	Antígenos leucocitários humano e a malária.....	32
1.4.2.	Antígenos leucocitários humano e vacina contra malária.....	33
1.5.	Justificativa.....	34
1.5.1.	Hipótese.....	35
2.	OBJETIVOS	36
2.1.	Geral.....	37
2.2.	Específico.....	37
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1.	Amostras.....	39
3.2.	Aspectos éticos.....	40
3.3.	Análises laboratoriais.....	40
3.3.1.	Extração do DNA.....	40
3.3.2.	Genotipagem da CSP das variantes do <i>P. vivax</i>	42
3.3.3.	Identificação dos polimorfismos do gene <i>HLA-DRB1</i>	43
3.3.4.	Avaliação sorológica do AMA-1.....	43
3.4.	Análise estatística.....	45

4.	RESULTADOS	46
4.1.	Freqüência dos alelos do gene <i>HLA-DRB1</i> nas amostras analisadas.....	47
4.2.	Resposta imunológica de anticorpos IgG contra o AMA-1 na Amazônia brasileira.....	49
4.3.	Associação entre a resposta de anticorpos contra o AMA-1 e a presença dos alelos HLA-DRB1.....	51
5.	DISCUSSÃO	53
6.	CONCLUSÃO	60
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
8.	ANEXO	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de risco de transmissão de malária no Brasil.....	3
Figura 2: Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.....	6
Figura 3: Contato primário, reorientação e invasão do eritrócito pelo Plasmódio e suas organelas.....	8
Figura 4: Estrutura do gene da CSP do <i>Plasmodium vivax</i>	9
Figura 5: Diagrama esquemático da estrutura do PvAMA-1.....	19
Figura 6: Processamento da proteína AMA-1 em <i>Plasmodium falciparum</i>	21
Figura 7: HLA, no braço curto do cromossomo 6.....	29
Figura 8: Estrutura da molécula de HLA de classe I e classe II.....	30
Figura 9: Apresentação de antígenos pela CAA através do caminho endógeno e exógeno.....	31
Figura 10: Reagentes utilizados no preparo da solução de lise 1.....	40
Figura 11: Reagentes utilizados no preparo da solução de lise 2.....	40
Figura 12: Frequência de reposta contra AMA-1 de acordo com o nível de anticorpos e quantidade de episódios de malária anterior.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição do sexo e idade de 115 indivíduos estudados.....	39
Tabela 2: Resultado da gota espessa de 112 indivíduos estudados.....	39
Tabela 3: Distribuição da quantidade de infecções anteriores entre 98 indivíduos estudados.....	39
Tabela 4: Freqüência das variantes nas amostras analisadas.....	41
Tabela 5: Freqüência alélica do gene <i>HLA-DRB1</i> nos indivíduos maláricos e não-maláricos provenientes da Amazônia brasileira.....	47
Tabela 6: Freqüência e nível de anticorpos IgG contra AMA-1 no soro de indivíduos infectados da região Norte do Brasil.....	48
Tabela 7: Freqüência de resposta de anticorpos contra AMA-1 em indivíduos infectados pelos genótipos de <i>Plasmodium vivax</i>	50
Tabela 8: Freqüência alélica do gene <i>HLA-DRB1</i> com a resposta para porção His ₆ -AMA-1.....	51

RESUMO

O presente estudo avaliou a relação entre a resposta de anticorpos contra AMA-1 das variantes de *P. vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) e os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* em populações endêmicas da Amazônia brasileira, para melhor entendimento dos mecanismos que modulam a resposta imune contra a malária. A resposta sorológica foi analisada em indivíduos maláricos e não-maláricos por testes de ELISA para AMA-1. Um subgrupo de amostras foi utilizado para genotipagem do gene *HLA-DRB1* por PCR-SSP. Foram detectados 13 alelos diferentes do gene *HLA-DRB1*, sendo o alelo HLA-DRB1*04 o prevalente na população estudada. Foi detectada uma alta frequência de respondedores para o antígeno AMA-1, com níveis crescentes de acordo com exposição prévia a malária. Nenhuma associação significativa foi observada entre as variantes da CSP do *P. vivax* e a resposta a AMA-1, bem como aos polimorfismos do *HLA-DRB1*. O *HLA-DRB1* apresenta uma distribuição heterogênea na população estudada, evidenciando uma contribuição característica de descendência ameríndia. A resposta de anticorpos contra o antígeno AMA-1 parece não influenciar na epidemiologia das variantes da CSP de *P. vivax*. Os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* não influenciam no desenvolvimento de resposta de anticorpos contra o AMA-1 na malária vivax na Amazônia brasileira.

Palavras chaves: Malária; antígenos leucocitários humano; *Plasmodium vivax*.

ABSTRACT

To better understand the mechanisms of the immune response modulation against malaria, this study evaluated the relationship among the antibody response to AMA-1 and variants of the circumsporozoite protein (CSP) of the *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) and the polymorphisms of *HLA-DRB1* gene in populations endemic from the Brazilian Amazon. The antibody response was analyzed in malarial and non-malarial individuals by AMA-1ELISA test. A subset of samples was genotyping of *HLA-DRB1* by PCR-SSP. We detected 13 different alleles of *HLA-DRB* gene, where the HLA-DRB1*04 was the commonest allele. A high frequency of responders to the antigen AMA-1 was detected, with increasing levels according to previous malaria experience. No significant association was observed among the response to *P. vivax* AMA-1 and, the variants of the CSP and the polymorphisms of *HLA-DRB* gene. The *HLA-DRB1* has a heterogeneous distribution in the population studied, showing an effective contribution of Amerindian groups. The antibody response against the antigen AMA-1 does not influence the epidemiology of variants of the CSP of *P. vivax*. The polymorphisms of *HLA-DRB1* gene do not influence the development of antibody response against AMA-1 in vivax malaria around the Brazilian Amazon region.

Keywords: Malaria; human leukocyte antigen; *Plasmodium vivax*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos da Malária

Apesar das primeiras evidências da malária terem sido descritas há 2700 anos a.C., na China, e o parasito ser descoberto há mais de 100 anos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2008), a malária permanece uma das mais importantes doenças parasitárias nas regiões tropical e subtropical do mundo, onde o clima quente e úmido é adequado para o desenvolvimento do mosquito vetor da doença (GREENWOOD et al., 2008). Mesmo com tentativas de controle durante muitas décadas (KIM et al., 2006), ainda pode-se dizer que sua incidência representa um problema de saúde pública preocupante (COWMAN & CRABB, 2006), devido sua alta prevalência e taxa de mortalidade (RUDOLFO et al., 2007). Em todo mundo, mais de dois bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de malária (SNOW et al., 2005), ocorrendo de 350 a 500 milhões de novos casos anualmente, que resultam em um milhão de mortes. (CDC, 2009).

No Brasil, foram registrados cerca de 600 mil casos em 2005, e recentemente, 2008, esses foram reduzidos à metade, devido a uma série de fatores, dentre os quais: maior investimento de recursos pelas três esferas de governo; mudança no esquema de primeira escolha para o tratamento do *Plasmodium falciparum*; aprimoramento do trabalho intersetorial e interinstitucional; capacitação dos profissionais de saúde nas análises de dados para focalização do problema e tomada de decisão e mobilização do setor político (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Dos casos, quase 100% estão concentrados na Amazônia Legal, região delimitada pelos Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia,

Roraima e Tocantins, totalizando 807 municípios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) (Figura 1). São relatados também, casos na região extra-amazônica, área brasileira não endêmica para malária. Os Estados do Paraná, São Paulo e Espírito Santo juntos, exigem um sistema de vigilância constante com o objetivo de detectar e tratar rapidamente os casos que surgem, evitando o aumento da transmissão autóctone. Estes Estados, por serem receptivos estão constantemente sujeitos a surtos devido ao fluxo constante de pessoas vindas de áreas endêmicas de dentro e fora do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

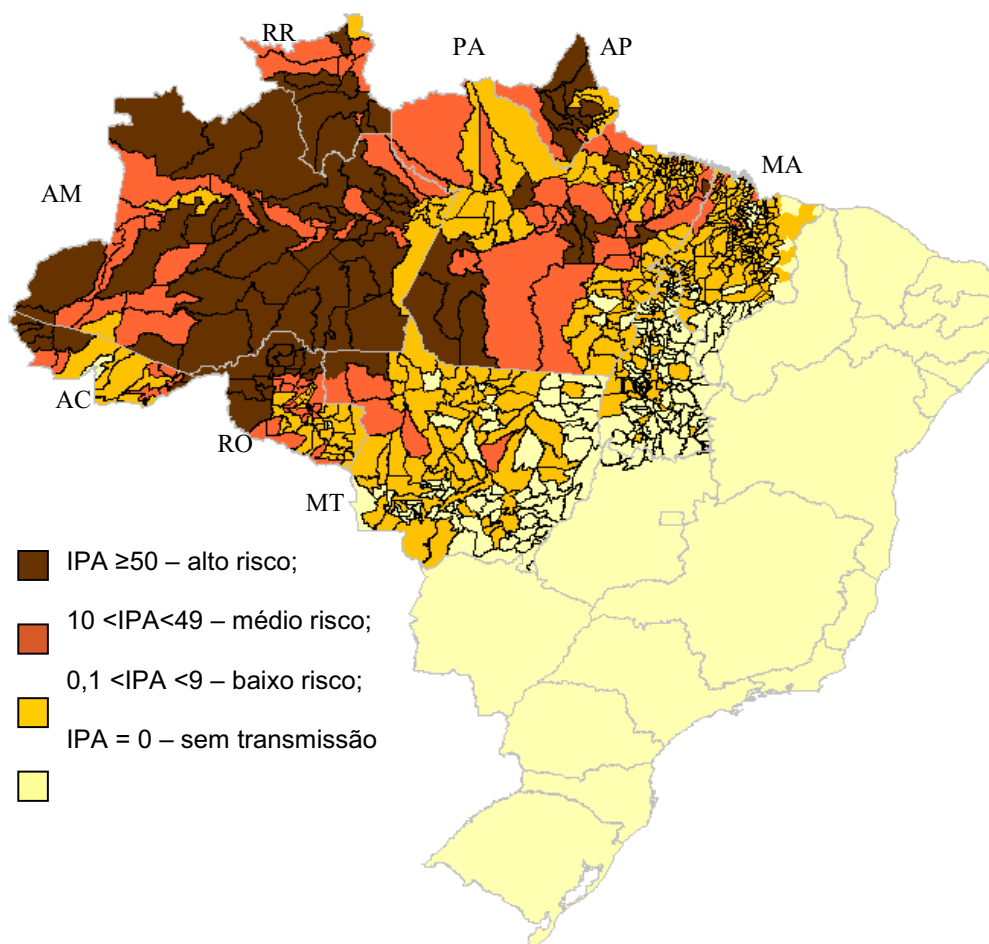


Figura 1: Mapa do risco de transmissão da malária no Brasil, 2007. Adaptado de Sivep_malária/SVS/MS – atualizado em 24.10.2008.

A malária é uma doença caracterizada principalmente por ciclos de calafrios, febre alta, sudorese excessiva, incapacitando e matando mais pessoas que qualquer outra doença parasitária no mundo (FRITSCH & SMITH, 1999).

Os parasitos da malária são protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium* e infectam diferentes hospedeiros vertebrados (GARNHAM, 1966), entre eles répteis, aves e mamíferos, incluindo humanos (COWMAN & CRABB, 2006). Quatro espécies parasitam humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. (CORNEJO & ESCALANTE, 2006), sendo no Brasil, os dois primeiros as espécies mais prevalentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). O *P. vivax* apresenta ampla distribuição geográfica e é responsável por cerca de 80 milhões de casos anuais de malária, especialmente na América Latina, Ásia e Oceania (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2007).

No Brasil, 80% dos casos são relacionados a malária por *P. vivax* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009) e, apesar de sua infecção raramente culminar na morte do paciente, é causa importante de morbidade e perda sócio-econômica (MENDIS et al., 2001). Acredita-se que este protozoário teve sua primeira entrada na população humana pelo sudeste da Ásia antes da origem do moderno *Homo sapiens*, com a transmissão do *P. vivax* do hospedeiro simiano para o *H. erectus* e se disseminou por todo Velho Mundo. Esses achados são baseados na proximidade filogenética com os parasitos de primatas não humanos do sudeste asiático (JONGWUTIWES et al., 2005). Entretanto, evidências arqueológicas apóiam que ambos, *P. vivax* e *P. falciparum* estavam ausentes no Novo Mundo na era pré-colombiana e foram

introduzidos depois da colonização europeia, presumivelmente como um resultado do tráfico de escravos africanos (DE CASTRO & SINGER, 2005).

O plasmódio pertence ao filo Apicomplexa, que apresenta forma característica, incluindo a presença de um complexo apical especializado, que é essencial para o processo de invasão (COWMAN & CRABB, 2006). As formas evolutivas extracelulares, capazes de invadir as células hospedeiras (esporozoítos, merozoítos e oocinetos), possuem seu complexo apical formado por organelas conhecidas como roptrias e micronemas, as quais estão diretamente envolvidas no processo de interiorização celular (BRAGA & FONTES, 2005). Em contraste com muitos outros organismos patogênicos, o plasmódio pode eficientemente infectar seus hospedeiros por rapidamente ganhar a entrada nas células usando seus próprios aparatos de invasão, para identificar, penetrar, e estabilizar a si próprio (COWMAN & CRABB, 2006).

Este protozoário tem um complexo ciclo de vida que envolve uma reprodução sexuada no mosquito vetor e um estágio assexuado no hospedeiro vertebrado (Figura 2). A infecção do hospedeiro humano pelo plasmódio inicia-se com a picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado, durante seu repasto sangüíneo. Este inocula o indivíduo com esporozoítos, formas móveis que rapidamente acessam a corrente sangüínea e então o fígado, invadindo os hepatócitos (CORNEJO & ESCALANTE, 2006). A fase hepática é assintomática e dura cerca de seis dias, com cada esporozoíto produzindo dezenas de milhares de merozoítos, que então invadem e desenvolvem-se dentro dos eritrócitos (ARAVIND et al., 2003).

A fase sangüínea da infecção inclui ambos os estágios assexuado e sexuado do parasito. No estágio sangüíneo assexuado, cada merozoíto produz de 8-20 novos

parasitos a cada 48 horas, proporcionando um aumento rápido do número de parasitos por hospedeiro. Neste estágio ocorre a doença propriamente dita, e o indivíduo infectado pode apresentar diversos sintomas, afetando diferentes sistemas orgânicos (WICKRAMARACHCHI et al., 2005). O estágio sexuado é representado por uma subpopulação de merozoítos que se diferenciaram em gametócitos, podendo ser ingeridos pelo mosquito vetor. No *Anopheles*, eles recombina-se durante um breve período de diploidia e geram esporozoítos geneticamente distintos

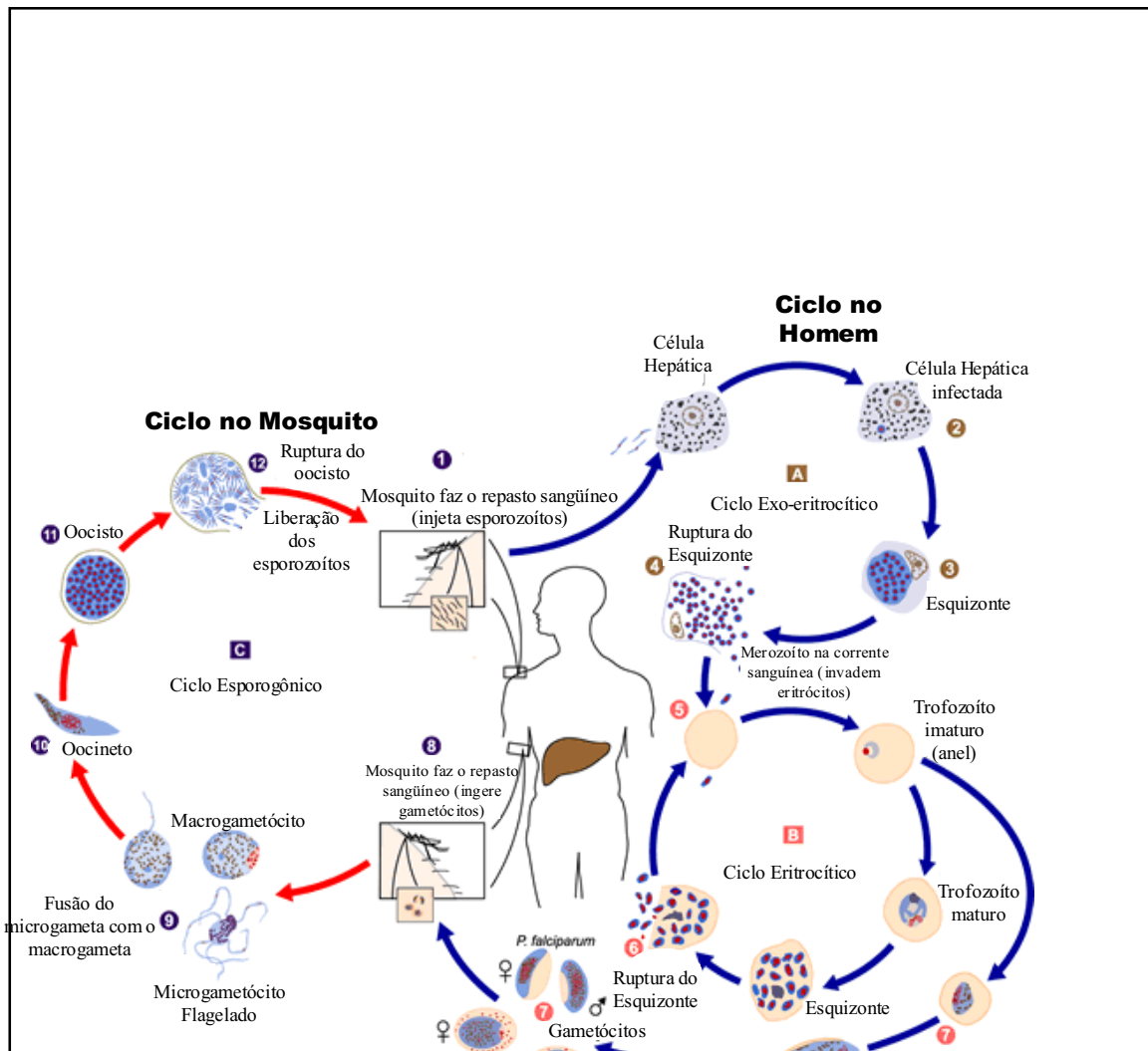


Figura 2: Ciclo biológico do *Plasmodium* spp. Adaptado de: <http://www.med.sc.edu:85/parasitology/blood-prot.htm>

(ARAVIND et al., 2003). O *P. vivax* possui a capacidade de permanecer dormente por meses como hipnozoítos nos hepatócitos, podendo ocorrer uma recidiva da infecção mesmo após tratamento (GREENWOOD et al., 2008).

Depois de sair do hepatócito, o merozoíto reconhece, liga-se e entra no eritrócito, e este processo ocorre rapidamente, provavelmente na ordem de 60 segundos. Não é surpreendente que este espaço de tempo seja curto e altamente eficiente, visto que os antígenos na superfície da forma extracelular do parasito são particularmente susceptíveis à resposta imune do hospedeiro (COWMAN & CRABB, 2006). O contato inicial entre o merozoíto e o eritrócito, é uma etapa crucial, de como o parasito pode distinguir entre o eritrócito competente para a invasão e outros tipos celulares. O reconhecimento da célula hospedeira e a aderência primária são relativamente à longa distância, aparentemente de pouca afinidade e reversível (BANNISTER & DLUZEWSKI, 1990). A ligação primária neste estágio parasitário parece que ocorre em algum ponto na superfície do parasito. A reorientação então é um evento que parece envolver a superfície do eritrócito ao redor do merozoíto. A proposta deste evento é a justaposição final do merozoíto com a membrana do eritrócito, permitindo uma interação mais próxima. Há uma movimentação da junção e o parasito desloca-se para o interior da célula, onde fica dentro de um vacúolo formado pela membrana plasmática do hospedeiro (COWMAN & CRABB, 2006) (Figura 3).

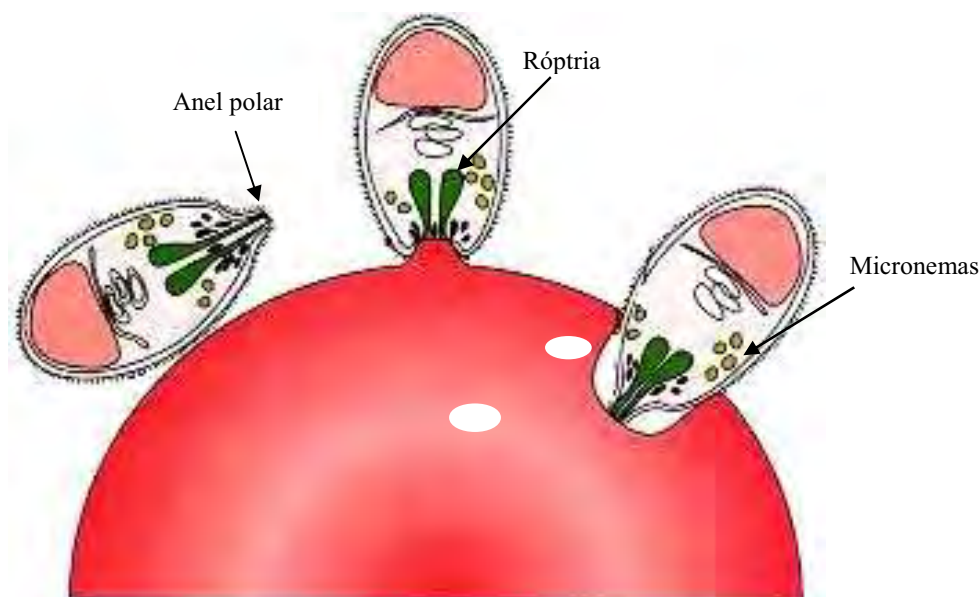


Figura 3: Contato primário, reorientação e invasão do eritrócito pelo Plasmodium e suas organelas. Adaptado de Chitnis & Blackman, 2000.

O *P. vivax* não invade eficientemente os eritrócitos maduros, tendo uma preferência em invadir reticulócitos. Esta propriedade reduz sua capacidade de causar malária severa e dificulta seu cultivo em laboratório, tornando custoso o progresso do entendimento de sua biologia. Entretanto, recentes estudos têm sido desenvolvidos usando cordão umbilical ou células eritróides como uma fonte de reticulócitos (PANICHAKUL et al., 2007; UDOMSANGPETCH et al., 2006).

1.2. Variantes do *Plasmodium vivax*

A proteína circunsporozoíta (CSP) é a principal proteína de superfície do esporozoíta, onde forma uma densa cobertura. No *P. vivax* ela apresenta variações na porção repetitiva do domínio central de seu gene (ROSEMBERG et al., 1989;

QARI et al., 1992) determinando três variantes nesta espécie de plasmódio (Figura 4).

A primeira forma caracterizada apresenta o nonapeptídeo GDRA(A/D)GQPA e foi denominada VK210; considerada a sua forma clássica (ARNOT, et al., 1985). Em isolados da Tailândia, Rosemberg e colaboradores (1989) observaram variações neste nonapeptídeo e denominou-o como VK247. Posteriormente, em Papua Nova Guiné, foi descrita a existência de uma variante denominada *P. vivax-like*, cuja seqüência da porção repetitiva da CSP possui homologia com a do *Plasmodium simiovale*, um parasito da malária de macacos, originalmente encontrado em *Macaca sinica*, no Sri Lanka (QARI et al., 1993a).

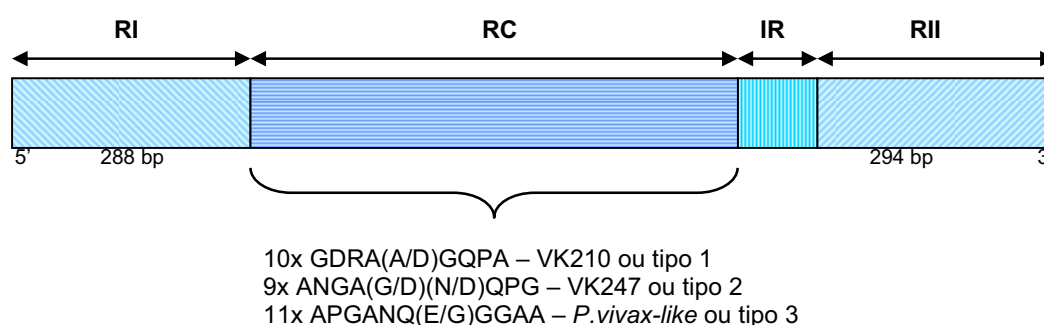


Figura 4: Estrutura do gene da CSP de *P. vivax*, com duas regiões altamente conservadas que não se repetem (RI e RII); uma região repetitiva de domínio central (RC) e uma pequena região de inserção (IR). As variações do peptídeo na proteína estão indicadas abaixo, de acordo com Qari e colaboradores (1993a).

Vários estudos têm conduzido à avaliação da distribuição global da variante VK247, a qual foi detectada em áreas endêmicas da Tailândia (WIRTZ et al., 1990, KAIN et al., 1992), América do Sul, África (KAIN et al., 1991), México, Afeganistão e Papua Nova Guiné (KAIN et al., 1992). Esta variante tem sido encontrada

freqüentemente como infecção mista com o genótipo VK210 (COCHRANE et al., 1990; WIRTZ et al., 1990; CURADO et al., 1995; ARRUDA et al., 1998). No entanto, no Afeganistão, na Tailândia, na Papua Nova Guiné e no México (QARI et al., 1992; KAIN et al., 1992) observa-se também infecções simples, fato mais comumente observado na Ásia do que na América do Sul (KAIN et al., 1992; QARI et al., 1992). Estudos de Qari e colaboradores (1993b) revelaram uma ampla distribuição da variante *P.vivax-like*, a qual foi encontrada em diferentes regiões do mundo, como Papua Nova Guiné, Brasil, Madagascar, Indonésia, Leste da África (KIMBI et al., 2005) e Guiana (BONILLA et al., 2006).

No Brasil, estudos sorológicos identificaram as três variantes em amostras de casos autóctones do Estado de São Paulo (CURADO et al., 1995) e de comunidades indígenas da região Amazônica (ARRUDA et al., 1998). Machado e Póvoa (2000) confirmaram, por diagnóstico molecular, a presença desses tipos variantes nos Estados de Rondônia, Amapá e Pará, descrevendo a ocorrência da VK210 em infecções puras, enquanto que a VK247 e *P. vivax-like* foram evidenciadas apenas em infecções mistas. Em 2003, Machado e colaboradores realizaram novo inquérito molecular no município de Belém, Estado do Pará, e observaram que sua distribuição não havia mudado após quatro anos de investigação. Observaram ainda, não haver associação entre os sinais e sintomas dos pacientes e os genótipos encontrados. Adicionalmente, verificaram a correlação entre negativação da parasitemia entre as três variantes, com um menor tempo de *clearence* em infecções com a VK247 quando comparada com as outras variantes, confirmando dados prévios no México com a VK210 e a VK247 (KAIN et al., 1993).

Em 2004, estudo sorológico realizado no Estado de Rondônia verificou uma maior produção de anticorpos contra a variante VK210, seguida pela *P.vivax-like*, e VK247, respectivamente (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004). Entretanto, outra investigação realizada em áreas endêmicas da Amazônia brasileira, observou maior nível de anticorpos contra a VK247 nos Estados de Rondônia, Pará e Mato Grosso, quando comparada a *P.vivax-like*. E ainda, que no Estado do Amazonas, o título de anticorpos para ambas as variantes foi baixo (ARRUDA et al., 2007).

Recentemente, a distribuição das variantes foi reavaliada em cinco áreas endêmicas do Brasil e observou-se que a variante VK210 continua sendo a mais prevalente. Entretanto, estes resultados demonstraram uma mudança na dinâmica da distribuição das variantes VK247 e *P.vivax-like*, visto que ambas foram observadas como infecções simples. Além disso, a *P.vivax-like* parece estar mais bem adaptada que a VK247, sugerindo uma introdução tardia desta última nos Estados de Rondônia, Amapá, Acre e Mato Grosso, uma vez que foi observada como infecção simples somente em Novo Repartimento, Estado do Pará. A *P.vivax-like* demonstrou ser amplamente distribuída nas cinco áreas estudadas (STORTI-MELO et al., 2009).

1.3. Antígenos candidatos à vacina

A primeira habilidade do parasito da malária, reconhecer e, então invadir os eritrócitos, é fundamental para o processo da doença. Antígenos localizados na superfície do parasito ou especificamente em organelas apicais do merozoíto têm sido caracterizados como alvo para proteção ou como possível vacina contra malária (MILLER et al., 2002).

Apesar de décadas de pesquisas, ainda não há uma vacina efetiva disponível para malária. As dificuldades apresentadas para o seu desenvolvimento estão relacionadas aos múltiplos estágios do ciclo de vida e número elevado de genes do parasito que apresentam uma diversidade de antígenos em potencial. Ademais, esses antígenos são altamente polimórficos, com sua expressão e correta dobra de proteínas recombinantes podendo dificultar esse objetivo almejado (BEENSON & CRABB, 2007).

A CSP tem sido estudada como potencial alvo para o desenvolvimento de uma vacina eficaz para o *P.vivax*, além dela, outros antígenos, como os do estágio eritrocítico do plasmódio também tem recebido atenção, tais como a proteína de ligação ao Duffy (DBP), proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1) e o antígeno 1 de membrana apical (AMA-1). Outras proteínas, ainda são estudadas, contudo em menor expressão. Tais como, membros da família da proteína de superfície do merozoíto 3 (MSP-3) (GALINSKI et al., 1999), proteína anônima relacionada a trombospondina (TRAP) (BARR et al., 1987) proteínas de ligação ao reticulócito (RBPs), proteína de superfície do merozoíto 9 (MSP-9) (VARGAS-SERRATO et al., 2002), Pvs28 (KONGKASURIYACHAI et al., 2004), Pvs25 (KONGKASURIYACHAI et al., 2004; WU et al., 2008), proteína relacionada à proteína anônima relacionada a trombospondina do circunsporozoíto (CTRP) (KANEKO et al., 2006) e a proteína relacionada ao fator von Willebrand A (WARP) (YUDA et al., 2001).

1.3.1. Proteína circunsporozoíta de superfície

Estudos têm demonstrado que a CSP medeia a adesão do esporozoíto à célula alvo e que ela é requerida para o desenvolvimento do esporozoíto no mosquito

vetor (MENARD et al., 1997). Apesar da seqüência de aminoácidos da CSP de todas as espécies de *Plasmodium* mostrar que elas possuem uma estrutura geral similar (SINNIS & NARDIN, 2002), apresentam epítomos específicos para cada espécie de plasmódio, representados por seqüências repetitivas de aminoácidos; conservadas para o *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. brasilianum* (BRANQUINHO et al., 1997).

É sabido que anticorpos para a CSP neutralizam a invasão dos esporozoítos nos hepatócitos (VANDERBERG et al., 1969) e que esta proteína possui alto potencial antigênico (KEMP et al., 1990). No entanto, sua utilização como alvo para o desenvolvimento de vacinas deve ser reavaliada devido à descoberta de variações em seu gene no *P. vivax* (ROSEMBERG et al., 1989; QARI et al., 1993a). Anticorpos monoclonais para região de repetição da CSP inibem a infectividade dos esporozoítos de *P. vivax* e *P. falciparum* em chimpanzés (NARDIN et al., 1982), mas não está clara sua associação entre os níveis de anticorpos naturalmente adquiridos para CSP e a proteção adquirida contra malária humana na África (HOFFMAN et al., 1987) e Ásia (WONGSRICHANALAI et al., 1991). Ainda, em regiões endêmicas do oeste africano, a prevalência dos anticorpos para CSP aumenta com a idade e está associada ao desenvolvimento da imunidade a doença (NARDIN et al., 1979).

Vacinas sintéticas e recombinantes da CSP foram os primeiros protótipos desenvolvidos e testados para malária. Embora pouco eficazes em humanos, tais vacinas mostraram induzir altos níveis de proteção em modelos animais (REED et al., 1997; ROGERS et al., 2002). A mais avançada vacina de malária para humanos, a RTS,S é baseada na CSP de *P. falciparum* (HEPPNER et al., 2005). Em vários testes clínicos, a vacina RTS,S tem mostrado conferir 40 a 60% de proteção por uma pequena duração de tempo, além de demonstrar ter um efeito benéfico contra

malária não complicada e severa em crianças do Moçambique, África (ALONSO et al., 2005).

Um número limitado de tentativas para desenvolver uma vacina baseada na proteína CS de *P.vivax* foram feitas. Estudos de vacinação com a proteína CS de *P.vivax* expressa em leveduras (BARR et al., 1987) no final dos anos 80 e início dos 90, induziram um grau limitado de imunidade em macacos (COLLINS et al., 1989) e uma pobre resposta imune em humanos (HERRINGTON et al., 1991). Subsequentemente, devido a limitações na imunogenicidade e dificuldades na produção, vacinas baseadas num peptídeo sintético foram desenvolvidas como peptídeos de antígenos múltiplos (MAPs) ou como peptídeos lineares e testados em primatas não-humanos e humanos, demonstrando resultados promissores por serem imunogênicas (HERRERA et al., 1997; UDHAYAKUMAR et al., 1998; HERRERA et al., 2005).

Em amostras de pacientes de uma comunidade endêmica do Estado de Rondônia, foi observado que a frequência de indivíduos com anticorpos para a região de repetição da CSP de *P.vivax* era baixa (variando de 24% a 34%) quando comparada às áreas de alta transmissão na África, onde mais de 70% dos adultos possuíam anticorpos anti-CSP de *P.falciparum* (NARDIN et al., 1979). Porém, quando consideraram a resposta absoluta para a região de repetição da CSP das variantes de *P.vivax*, 49% dos indivíduos da área estudada responderam para um ou mais epítomos, sugerindo que nesta população, anticorpos contra a malária vivax é naturalmente adquirida (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004).

Uma vacina construída a partir de um modelo sintético do códon que modula a CSP, onde foram incorporadas as partes N- e C- terminais, além da região de

repetição que contém a seqüência repetida das variantes de *P.vivax* VK210 e VK247, demonstrou induzir resposta imune altamente potente em cepas de ratos geneticamente diferentes. A proteína recombinante apresentou propriedades biológicas exibidas pela CSP nativa e induziu altos títulos de anticorpos que reconhecem e causam aglutinação dos esporozoítos no fígado, um indicador da perda de virulência dessa forma do parasito. Ainda, esta proteína recombinante pareceu induzir uma resposta imunologicamente balanceada contra a região de repetição central, N- e C- terminal dos dois principais isolados de *P.vivax* (YADAVA et al., 2007).

1.3.2. Proteína de ligação ao Duffy (DBP)

A DBP é uma proteína de 140 KDa pertencente a uma família de proteínas de ligação ao eritrócito, caracterizada por uma região funcionalmente conservada rica em cisteína que em geral, localiza-se dentro do micronema dos merozoítos de diversas espécies de *Plasmodium* (FANG et al., 1991; ADAMS et al., 1992) e estão envolvidas na adesão e invasão das células hospedeiras (BEENSON & CRABB, 2007). No *P.vivax* e o parasito da malária símia, o *P.knowlesi*, a DBP se liga ao antígeno Duffy/receptor para citocinas (DARC) durante a invasão dos reticulócitos pelo parasito (ADAMS et al., 1990; CHITNIS & MILLER, 1994).

A DARC é um antígeno do sistema histo-sangüíneo expresso na superfície dos reticulócitos e eritrócitos, podendo também funcionar como receptor para citocinas. A DBP do *P.vivax* (PvDBP) parece ser essencial para invasão, e a resistência ao parasito é conferida pela falta da expressão de DARC (MILLER et al.,

1976; SINGH et al., 2005), um fenótipo comum na população africana (BEENSON & CRABB, 2007).

No momento da invasão do merozoíto, a DBP está localizada no micronema, e é liberada antes de ser requerida para invasão. Esta interação está associada com a formação da junção mais próxima, que se move por toda a superfície do merozoíto, com a entrada do parasito no eritrócito (ADAMS et al., 1990). A face da proteína que se liga ao receptor é pouco polimórfica, enquanto a região da face oposta possui muitos resíduos polimórficos, sugerindo esta estar sob pressão de seleção e ser alvo da resposta de anticorpos adquiridos (SINGH et al., 2006). Pode ser possível desenvolver uma vacina que predominantemente tenha como alvo a região conservada para bloquear a interação PvDBP-DARC (BEENSON & CRABB, 2007). Entretanto, estudos recentes demonstram a transmissão deste parasito em indivíduos Duffy negativos na África (RYAN et al., 2006) e na Amazônia brasileira (CAVASINI et al., 2007), provavelmente por meio de outros ligantes envolvidos no reconhecimento eritrocitário que não a DBP (GALINSKI et al., 1992).

Em indivíduos vivendo em área de transmissão instável de malária no Brasil, observou-se que a exposição ao *P. vivax* por mais de dez anos induz a produção de anticorpos anti-DBP, capazes de inibir a interação eritrócito-DBP. Por necessitar de uma infecção crônica para a indução de resposta inibitória mais eficiente, que reconheça diferentes variantes da DBP_{II}, é sugerido que esta proteína seja pouco imunogênica (CERAVOLO et al., 2008).

1.3.3. Proteína de superfície do merozoíto-1 (MSP-1)

O merozoíto é coberto uniformemente por um complexo de proteínas que compreendem quatro polipeptídeos derivados do precursor da MSP-1 em associação com duas outras proteínas codificadas por genes distintos (BLACKMAN & HOLDER, 1992), sendo sintetizada como um precursor de grande peso molecular (180-230 KDa) que contém seis domínios polimórficos (quatro deles repetitivos) flanqueados por seqüências completamente conservadas durante a esquizogonia e depois processada em vários fragmentos menores correspondentes à proteína de superfície do merozoíto (PUTAPORNTIP et al., 2002).

Durante o processo de invasão, uma etapa de quebra proteolítica libera muitas moléculas de membrana do merozoíto e somente um fragmento âncora de glicerol-fosfatidil-inositol de 19 KDa do terminal C (MSP1₁₉) é levado para o interior do eritrócito recém invadido (BLACKMAN et al., 1990; PIRSON & PERKINS, 1985). A importância biológica da MSP1₁₉ para a sobrevivência do parasito é desconhecida, entretanto é bem estabelecido que anticorpos reconheçam sua região C terminal e inibam a invasão do merozoíto *in vitro* (BURNS et al., 1989; CHAPPEL & HOLDER, 1993; DALY & LONG, 1995; KOUSSIS et al., 2009). Desta forma, induzem uma resposta imune que protege contra o crescimento do parasito no estágio sangüíneo, sendo base de vários experimentos de vacinas para o estágio eritrocítico (CHITNIS & BLACKMAN, 2000).

Certos anticorpos contra a MSP1₁₉ podem prevenir a quebra proteolítica do complexo, prevenindo então a invasão do eritrócito, identificando isto como um mecanismo potencialmente importante da imunidade humoral. Entretanto, a ligação desses anticorpos pode ser bloqueada por outro grupo de anticorpos que

reconhecem epítomos adjacentes e de transição e não possuem efeito sobre a quebra proteolítica da MSP1₁₉ (CHITNIS & BLACKMAN, 2000).

No Brasil, a prevalência de respondedores e níveis de anticorpos (IgG e subclasses) específicos não foram associados ao aumento na transmissão de malária. Indivíduos dos grupos de Belém, capital do Estado do Pará, Cuiabá e Terra Nova do Norte, no Estado do Mato Grosso, que foram menos expostos a transmissão de malária mostraram significativamente maior nível de IgG anti-MSP1₁₉ específica quando comparados aos indivíduos de Apiacás, norte do Mato Grosso, área de intensa transmissão de malária. Adicionalmente, os resultados revelaram que 40% dos indivíduos com exposição à malária focal, mostraram uma resposta positiva de IgG anti-MSP1₁₉ mesmo passados oito meses da transmissão e 28% sete anos depois. Interessantemente, os anticorpos anti-MSP1₁₉ persistiram somente entre os indivíduos que tiveram malária clínica (MORAIS et al., 2005).

Ainda, em 2007, outro estudo constatou baixa resposta para quinze proteínas recombinantes correspondendo a variantes da PvMSP-1 em indivíduos não infectados expostos a malária na Amazônia rural. O domínio invariante de 19kDa (PvMSP-1₁₉) foi reconhecido por 54,3% dos indivíduos. A resposta de anticorpos para o repertório de domínios variáveis do PvMSP-1, aos quais os indivíduos estão continuamente expostos, foi obtida somente depois de várias infecções repetidas. Este fato pode requerer um estímulo freqüente, oferecendo um obstáculo no desenvolvimento de uma subunidade de vacina baseada no PvMSP-1 (BASTOS et al., 2007).

Na Bacia Amazônica, foram encontrados indivíduos com alta taxa de anticorpos para IgG contra PvMSP-1₁₉ (64,0 – 69,6%). A proporção de indivíduos

com anticorpos mostrou-se associada a idade, ao lugar de residência e ao envolvimento habitual com atividades de alto risco, definindo grupos de pessoas altamente expostas, que podem ser alvos preferenciais de medidas de controle (LADEIA-ANDRADE et al, 2007).

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

Dentre os vários candidatos à vacina, o antígeno do estágio sangüíneo assexuado AMA-1, é considerado um importante candidato à vacina da malária. (WATERS et al., 1990; HEHL et al., 2000; GAFFAR et al., 2004). Acredita-se ser único ao filo Apicomplexa e derivado de um único gene essencial, presente em todas as espécies de *Plasmodium*. Estudos iniciais do plasmódio mostraram que a função do AMA-1 pode ser bloqueada por anticorpos que inibem a multiplicação *in vitro* do parasito na fase assexuada eritrocitária (DEANS et al., 1982). O AMA-1 é uma proteína integral de membrana tipo 1 imunogênica (PETERSON et al., 1989; NARUM & THOMAS, 1994; GALINSKI & BARNWELL, 1996; RILEY et al., 2000) com no mínimo 16 resíduos de cisteína incorporados em 8 pontes dissulfídicas formando três domínios da proteína (HODDER et al., 1996).

A comparação da estrutura do AMA-1 do *P. vivax* (PvAMA-1) (Figura 5) com outras estruturas tridimensionais conhecidas mostrou que os domínios I e II são similares e pertencem à superfamília do módulo PAN (UDHAYAKUMAR et al., 2001). Esta superfamília é relacionada a proteínas com diversas funções de adesão, ligando-se a receptores proteínas ou carboidratos (BANNISTER et al., 2003).

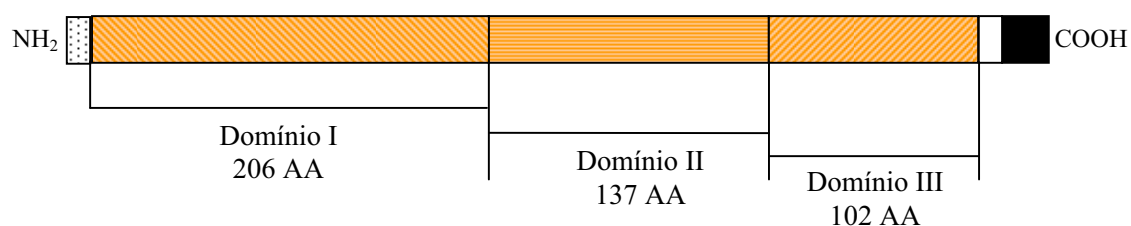


Figura 5: Diagrama esquemático da estrutura da PvAMA-1. ▨ Peptídeo sinal (Pré-seqüência); □ Região de transmembrana; ■ Região citoplasmática. Adaptado de Múfalo e colaboradores (2008).

O AMA-1 do *P. falciparum* é sintetizado tardiamente durante o desenvolvimento do esquizonte nas últimas quatro horas da fase eritrocítica (NARUM & THOMAS, 1994), como uma proteína precursora de 83 kDa, que inicialmente está localizada no micronema do complexo apical do merozoíto e do esporozoíto (BANNISTER et al., 2003). Esta etapa coincide com o desenvolvimento das roptrias (TRIGLIA et al., 2000). Posteriormente, ela é processada a um peptídeo de 66 kDa, antes de sua relocação na superfície do merozoíto maduro. Uma vez na superfície, este fragmento peptídico é redistribuído e sofre nova clivagem que pode ocorrer em dois sítios alternativos da porção C-terminal (Figura 6): ou logo abaixo do domínio III, próximo a membrana do parasito, produzindo um fragmento de 48 kDa, ou entre os domínios II e III, gerando um fragmento de 44 kDa. Os fragmentos clivados são liberados da superfície do parasito (PETERSON et al., 1989; NARUM & THOMAS, 1994; HOWELL et al., 2001; HOWELL et al., 2003). Não existem evidências de que os fragmentos de 44 kDa e 48 kDa liberados possam ligar aos eritrócitos. Entretanto, há evidências que as adesinas envolvidas na invasão celular pelos parasitos Apicomplexa podem agir de uma maneira cooperativa, talvez se agrupando no movimento de junção, na forma de homo ou heteromultímeros, para permitir uma

multivalência com alta avidade de interação com receptores da célula hospedeira (HOWELL et al., 2001).

Dessa maneira, acredita-se que a proteína AMA-1 desempenhe uma função no início do processo de invasão do eritrócito, fazendo parte da reorientação do merozoíto. Além disso, pode estar envolvida no início do contato íntimo entre essas duas células, que é dependente da proteína de ligação ao Duffy (MITCHELL et al., 2004). Estudo recente com PfAMA-1, demonstrou que esta proteína não é somente uma parte essencial no movimento da junção, mas também que a fosforilação do domínio citoplasmático pode ser um pré-requisito para invasão de sua célula alvo (TREECK et al., 2009).

Extensivos dados do polimorfismo do AMA-1 em *P.vivax* tem sido obtidos da Ásia, Oceania e África (CHENG & SAUL, 1994; FIGTREE et al., 2000; CHUNG et al., 2003; GUNASEKERA et al., 2007; RAJESH et al., 2007), mas há uma relativa falta de dados da América do Sul, incluindo o Brasil. No nosso país, os dados disponíveis mostram somente a seqüência que envolve o domínio I de 20 isolados. São observados 13 lugares polimórficos e oito haplótipos, que foram relatados em três Estados brasileiros, Amapá, Porto Velho e Rondônia (RODRIGUES et al., 2005).

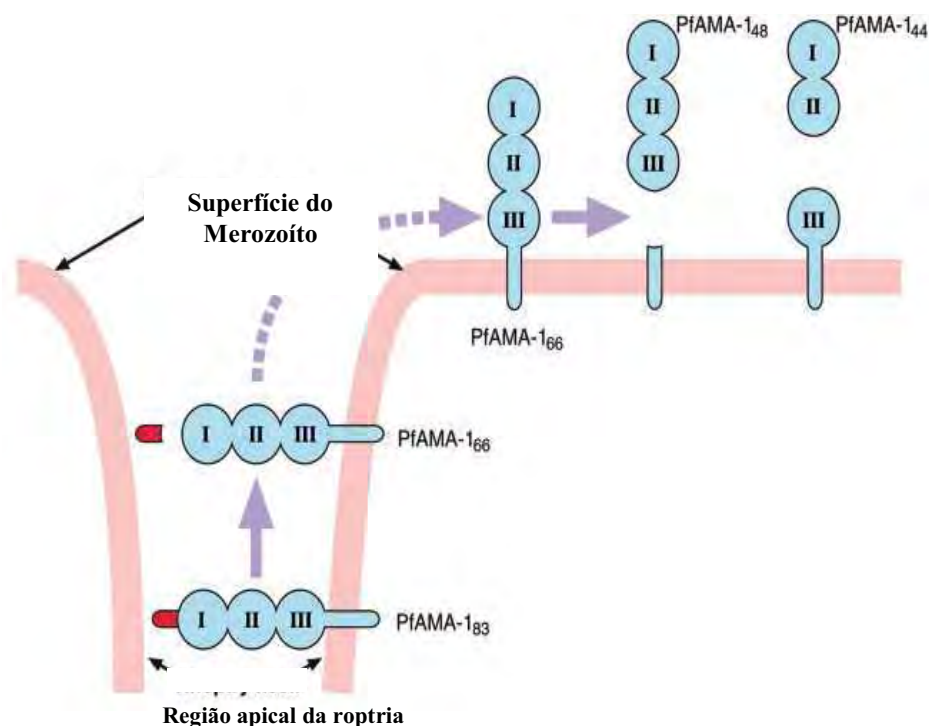


Figura 6: Processamento da proteína AMA-1 em *P.falciparum*. Adaptado de Howell *et al.*, 2001.

A seqüência de *PvAMA-1* encontrada em isolados do Brasil parece representar uma amostra de sua diversidade genética de todo o mundo, por não formar grupos. Foram encontrados isolados de diferentes partes do mundo em toda árvore filogenética (GRYNBERG *et al.*, 2008). Observa-se que ela é extremamente conservada e imunogênica durante a infecção natural (SOARES *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2005), e que alguns indivíduos mostram reação cruzada a diferentes epítomos presentes em diferentes alelos da proteína (RODRIGUES *et al.*, 2005).

A seqüência de *AMA-1* é relativamente conservada entre várias espécies de plasmódio, com um nível na seqüência da identidade de aminoácidos excedendo 50% em comparação a todas as outras seqüências conhecidas (MARSHALL *et al.*,

1989; PETERSON et al., 1990; WATERS et al., 1990; CHENG & SAUL, 1994; DUTTA et al., 1995; MARSHALL et al., 1996). Variações nesta seqüência, resultado de uma mutação pontual, são observadas entre os alelos do *ama1* de *P.falciparum* (PETERSON et al., 1989; THOMAS et al., 1990; MARSHALL et al., 1996), *Plasmodium knowlesi*, parasito de macacos (WATERS et al., 1991), *P.vivax* (CHENG & SAUL, 1994), e *Plasmodium chabaudi*, parasito de roedores (CREWETHER et al., 1996).

Em 2000, demonstrou-se que a interrupção do gene *Pfama-1* parece ser deletéria ao crescimento do parasito no estágio sangüíneo. Ademais, que a expressão do PcAMA1 (AMA-1 de *P. chabaudi*) no *P. falciparum* permitiu que esses parasitos invadissem eritrócitos murinos mais eficientemente. Concluiu-se então, que esta proteína fornece uma função crítica na invasão dos eritrócitos pelos merozoítos nas espécies de plasmódio. Além do mais, não foi possível isolar o parasito com este gene interrompido, confirmando seu papel no ciclo eritrocítico. Foram observados também, muitos merozoítos ao lado da superfície de eritrócitos, sugerindo uma correta ligação e reorientação, mas uma inabilidade para completar o processo de invasão (TRIGLIA et al., 2000). O único processo celular bem caracterizado que ocorre ao redor na hora da invasão e definitivamente envolve AMA-1 é seu processo proteolítico secundário e a redistribuição na superfície do merozoíto (NARUM & THOMAS, 1994; HOWELL et al., 2001; HOWELL et al., 2003).

A resposta imune protetora é vagarosamente adquirida depois de repetidas infecções, e seu considerável polimorfismo genético em muitos antígenos alvo dentro da população local e a variação genética são devidos à expressão diferencial de genes dentro dos genomas do parasito (CONWAY & POLLEY, 2002). Por meio de

estudos em animais e *in vitro* da inibição do crescimento do parasito, está claro que alguns polimorfismos no gene *AMA-1* reduzem a susceptibilidade ao ataque de anticorpos. Epítomos conservados existem e podem ser bloqueados por anticorpos (REMARQUE et al., 2007). Estudos com ratos infectados com *P.chabaudi* indicam que esta variação é imunologicamente significativa, onde a imunização com AMA-1 ou anticorpos anti-AMA-1 passivamente transferidos, não protegeram das cepas heterólogas de *P.chabaudi*, indicando que a proteção do anticorpo reconhece epítomos cepa específica (HODDER et al., 2001).

A primeira evidência que a AMA-1 era uma proteína candidata à vacina foi em estudos com *P. knowlesi* (DEANS et al., 1988). Um anticorpo monoclonal que inibiu a invasão deste parasito *in vitro*, reagiu com uma proteína de 66 KDa localizada inicialmente nas roptrias, mas que parcialmente eram transferidas para a superfície do merozoíto antes da liberação do esquizonte (COLLINS et al., 1994).

A imunização ativa de macacos ou ratos com formas de AMA-1 nativa (DEANS et al., 1988) ou recombinante (ANDERS et al., 1998; COLLINS et al., 1994) tem protegido estes animais contra parasitos de símios e roedores, respectivamente. Além do mais, a imunização passiva com anticorpos policlonais específicos para AMA-1 previne ratos infectados com *P. chabaudi* de desenvolver uma parasitemia letal (ANDERS et al., 1998).

Anticorpos anti-AMA-1 humano naturalmente adquirido e de coelho reconhecem cepas específicas e epítomos conservados, fornecendo fortes evidências de que esta proteína é um alvo natural da resposta de proteção do anticorpo e, ainda, anticorpos direcionados a ela são capazes de inibir a invasão de eritrócitos

pelo merozoíto de três linhagens de *P.falciparum* expressando diferentes formas de AMA-1 (HODDER et al., 2001).

Mitchell e colaboradores (2004) utilizaram anticorpo monoclonal de rato (Mab R31C2) contra epítopo de AMA-1 de *P.knowlesi* e observaram que o contato entre o merozoíto e o eritrócito ocorria normalmente na presença do anticorpo, mostrando que o AMA-1 não tem função em parte desse estágio de ligação. Porém, os merozoítos não conseguiam se reorientar, fazendo com que seu contato apical íntimo com a membrana da célula não ocorresse, impedindo sua invasão na mesma. Isso demonstrou que o gradiente de AMA-1 no parasito livre (maior no ápice e menor em direção ao pólo basal) estava diretamente envolvido na reorientação do merozoíto no eritrócito ou ele poderia estabilizar a ligação do merozoíto no eritrócito antes da junção mais próxima.

Em ensaio com anticorpo policlonal e monoclonal de fragmentos de AMA-1 de *P.falciparum*, observou-se que anticorpos policlonais anti-AMA-1 ligam-se a formas solúveis de AMA-1 no merozoíto, causando processo anômalo, e inibem a redistribuição do AMA-1 nativo do complexo apical na superfície do merozoíto (DUTTA et al., 2005). Os autores sugeriram então, que anticorpos para AMA-1 podem inibir a invasão não exatamente pela ligação em lugares biologicamente críticos na proteína, mas também pelo bloqueio estérico ao acesso nos lugares de quebra para as proteases processar o AMA-1, ou pela ligação e bloqueio da redistribuição do AMA-1 na superfície na hora da invasão.

Um estudo demonstrou que uma proteína recombinante contendo o ectodomínio do AMA-1 de *P. vivax* é naturalmente imunogênica nos indivíduos que tiveram distintos graus de exposição à malária em áreas endêmicas no Brasil

(MORAIS et al., 2006), entretanto, a alta prevalência de anticorpos específicos para PvAMA-1 é explicada pelo fato de que a região codificadora do domínio variável do gene *Pv-AMA1* mostra limitado polimorfismo sobre isolados brasileiros (RODRIGUES et al., 2005).

Por meio da produção de cinco proteínas recombinantes bacterianas representando cada domínio do PvAMA-1, separadamente ou em combinação (DI-II e DII-III), Múfalo e colaboradores (2008) observaram que as proteínas contendo o domínio II foram mais frequentemente reconhecidas pelos anticorpos humanos, enquanto que a resposta de anticorpos IgG para DI e DIII individualmente foi menor. Quando imunizaram ratos com a proteína purificada, verificaram que esses foram capazes de gerar anticorpos para todos os cinco domínios recombinantes, entretanto, DI-II foi o mais reconhecido. Observaram ainda, que soros de indivíduos vivendo em diferentes áreas do oeste africano e do Brasil, diagnosticados inequivocadamente como malária por *P.falciparum*, reagem contra DII de PvAMA-1.

Como o gene *AMA-1* está também localizado no micronema do complexo apical do esporozoíto (BANNISTER et al., 2003) e em merozoítos do estágio hepático (REMARQUE et al., 2007), é sugerido que ele tenha contribuição na presença de anticorpos para PvAMA-1 sobre indivíduos tratados profilaticamente, podendo abolir a infecção antes da detecção do parasito na gota espessa (MORAIS et al., 2006). Além disso, indivíduos vacinados podem reduzir a taxa de infecção e a resposta imune celular pode reduzir a viabilidade do parasito no ciclo exo-eritrocítico (REMARQUE et al., 2007).

Teste de fase 1 de vacina anti-AMA-1 de *P.falciparum* em crianças e adultos em áreas de intensa transmissão de malária estacional, demonstrou uma boa

resposta de anticorpos nas duas primeiras doses. Na terceira, administrada apenas nos adultos, não houve aumento significativo da resposta de anticorpos, ou mesmo esta se mostrou ausente. Num período de um ano, a partir do dia 154 na segunda dose nas crianças, o nível de anticorpos começou a cair drasticamente. Ainda não é conhecido o nível de anticorpos capaz de produzir uma proteção. Apesar disso, a vacina demonstrou ser imunogênica e bem tolerada (DICKO et al., 2007; DICKO et al., 2008).

Sobre antígenos do estágio sangüíneo de *P.falciparum*, análises de freqüências de alelos produzem uma forte evidência do bloqueio na região 2 do *msp1* (CONWAY et al., 2000) e os domínios I e III de AMA1 (POLLEY & CONWAY, 2001; POLLEY et al., 2003), parece que os níveis de anticorpos para AMA-1 são maiores que outros candidatos ao estágio sangüíneo (CHELIMO et al., 2005).

Estudos para anticorpos naturalmente adquiridos contra esses antígenos polimórficos particulares de *P.falciparum* apóiam a hipótese de que eles são alvos de resposta que protege contra a malária clínica (CAVANAGH et al., 2004; CONWAY et al., 2000; METZGER et al., 2003; POLLEY et al., 2004; POLLEY et al., 2007). Entretanto, em alguns casos, como para AMA-1, os dados não determinaram se a resposta imune efetiva é contra epítomos polimórficos ou se a imunidade é direcionada principalmente à epítomos conservados, podendo assim exercer alguma seleção dependente da freqüência (CONWAY, 2007).

Em 2007, Barbedo e colaboradores, analisando a freqüência de respondedores e sua persistência de resposta para o AMA-1, MSP1₁₉ e a região II da DBP do *P.vivax*, observaram que há uma maior freqüência de respondedores para AMA-1 e a região II da DBP quando os indivíduos são expostos a múltiplas

infecções. Em contrapartida, a resposta IgG específica para MSP1₁₉ ocorre mais precocemente em uma única exposição a infecção, sendo ela altamente imunogênica, como observado previamente (PARK et al., 2001; LIM et al., 2002; RODRIGUES et al., 2003; MORAIS et al., 2005; WIRCHRAMARACHCHI et al., 2007). Porém, sua resposta é a única que diminui significativamente num período de nove meses. Ainda, foi observado que a frequência de respondedores para AMA-1 aumenta ligeiramente depois do tratamento, e que a grande maioria dos indivíduos (85,7%) que tornaram sorologicamente negativos para MSP1₁₉ continuou com anticorpos detectáveis para AMA-1.

Recentemente, a avaliação do efeito da PvAMA-1 e da PvMSP1₁₉ em doadores de sangue não infectados de uma área não endêmica para malária, em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, evidenciou que a primeira proteína tinha um impacto na resposta imune, enquanto o MSP1₁₉ não. Verificaram ainda, que a quantidade IFN γ e TNF α induzidos pelo AMA-1 poderia ser suficiente para direcionar a resposta imune celular capaz de eliminar o parasito. Adicionalmente, os achados mostraram que o AMA-1 induz um perfil imunológico alterado na resposta imune inata, principalmente associado a células dendríticas e possivelmente monócitos, podendo esse efeito ser importante na destruição do parasito. Os autores acreditam que seja possível que uma sub-regulação da resposta imune inata pelo plasmódio possa ser benéfica para a sobrevivência desse parasito e possa diminuir a resposta inflamatória do hospedeiro, desta forma reduzindo a possibilidade de resposta nociva para infecção. Entretanto, o perfil inflamatório obtido pela AMA-1 pode sugerir que a vacinação com este antígeno recombinante possa contribuir para uma resposta imune adaptativa contra a infecção da malária (BUENO et al., 2008).

1.4. Complexo Principal de Histocompatibilidade

Fatores genéticos da resposta imune, correspondentes aos genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), parecem controlar a eficiência da resposta humoral nas vacinações. (NARDIN et al., 2000).

O MHC na espécie humana é denominado Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) e, seus antígenos podem ser divididos em duas classes principais: HLA de classe I e HLA de classe II. A glicoproteína de HLA é determinada por genes que se localizam no braço curto do cromossomo 6 (6p21) e os principais genes do HLA de classe II são denominados *HLA-DRB*, *HLA-DP* e *HLA-DQ*, sendo ainda, o sistema genético humano mais polimórfico, com diferentes alelos podendo codificar sua molécula (CHOO, 2007). Esses polimorfismos podem alterar a habilidade para ligar peptídeos e apresentá-los às células T, dessa forma, tendo potencial para modular a resposta de anticorpos (PATARROYO et al., 1991).

A região de classe I contém os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* que codificam a cadeia pesada das moléculas de HLA de classe I. Enquanto a região de classe II consiste de uma série de sub-regiões, cada uma contendo genes *A* e *B*, que codificam as cadeias α e β respectivamente (MARSH et al., 2004). O gene *HLA-DR* consiste de um único gene *HLA-DRA* e nove genes *HLA-DRB* (*DRB1* a *DRB9*). O gene *HLA-DRA* codifica uma cadeia invariável e liga a várias outras cadeias β codificadas pelos genes *HLA-DRB*. Antígenos específicos *HLA-DRB* (*DR1* a *DR18*) são determinados por cadeias *DR β 1* polimórficas codificadas por alelos *DRB1*. Ainda, certos alelos do haplótipo *DRB1*, ligam-se especificamente ao *DRB3*, *DRB4* ou *DRB5*. Nos genes *HLA-DP* e *HLA-DQ*, a expressão é feita por um gene das

cadeias α e β e um pseudogene adicional não expresso. Os produtos do gene *HLA-DQA1* e *HLA-DQB1* se associam para formar moléculas DQ, e produtos do gene *HLA-DQA1* e *HLA-DQB1*, para formar moléculas DP (CHOO, 2007). Ainda, existe a região de classe III do gene *HLA*, que contém genes do complemento (C2, C4 e fator B), 21-hidroxiase, fator de necrose tumoral (TNFs) entre outros (BECK & TROWSDALE, 2000) (Figura7).

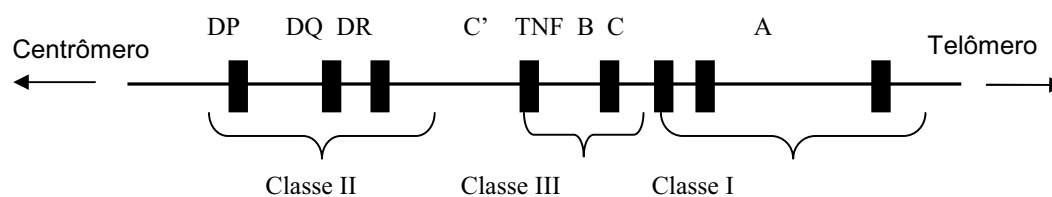


Figura 7: HLA, no braço curto do cromossomo 6. Regiões do HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ, que consistem de uma ou mais regiões dos genes A e B respectivamente; TNF (fator de necrose tumoral); C' (genes do complemento). Adaptado de Choo, 2007.

Estruturalmente, as moléculas de HLA de classe I consistem de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente: uma cadeia α de 44 a 47kD (cadeia pesada) codificada pelos genes de classe I e uma subunidade de 12 kD codificada por um gene localizado fora da região HLA, chamada de β_2 -microglobulina (cadeia leve). Apresentam uma fenda de ligação à peptídeos formada pelas cadeias α_1 e α_2 , que interagem para formar uma plataforma de tamanho suficiente para ligar peptídeos de 8 a 11 aminoácidos, além de possuírem um segmento α_3 da cadeia que contém uma alça que serve de local de ligação para o co-receptor CD8. Já as

moléculas de HLA de classe II, são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente, uma cadeia α com 32 a 44 kD, e uma cadeia β de 29 a 32 kD, sendo ambas codificadas por genes do HLA. Os segmentos aminoterminais $\alpha 1$ e $\beta 1$ interagem para formar a fenda de ligação a antígenos (STERN et al., 1994; ZHU et al., 2003), que é estruturalmente semelhante à fenda das moléculas de HLA de classe I, porém, suas extremidades são abertas, permitindo a ligação de peptídeos de 30 aminoácidos ou mais. Ainda, essas moléculas apresentam uma alça de ligação para as células CD4, formada pelo segmento $\beta 2$ (ABBAS, 2008) (Figura 8).

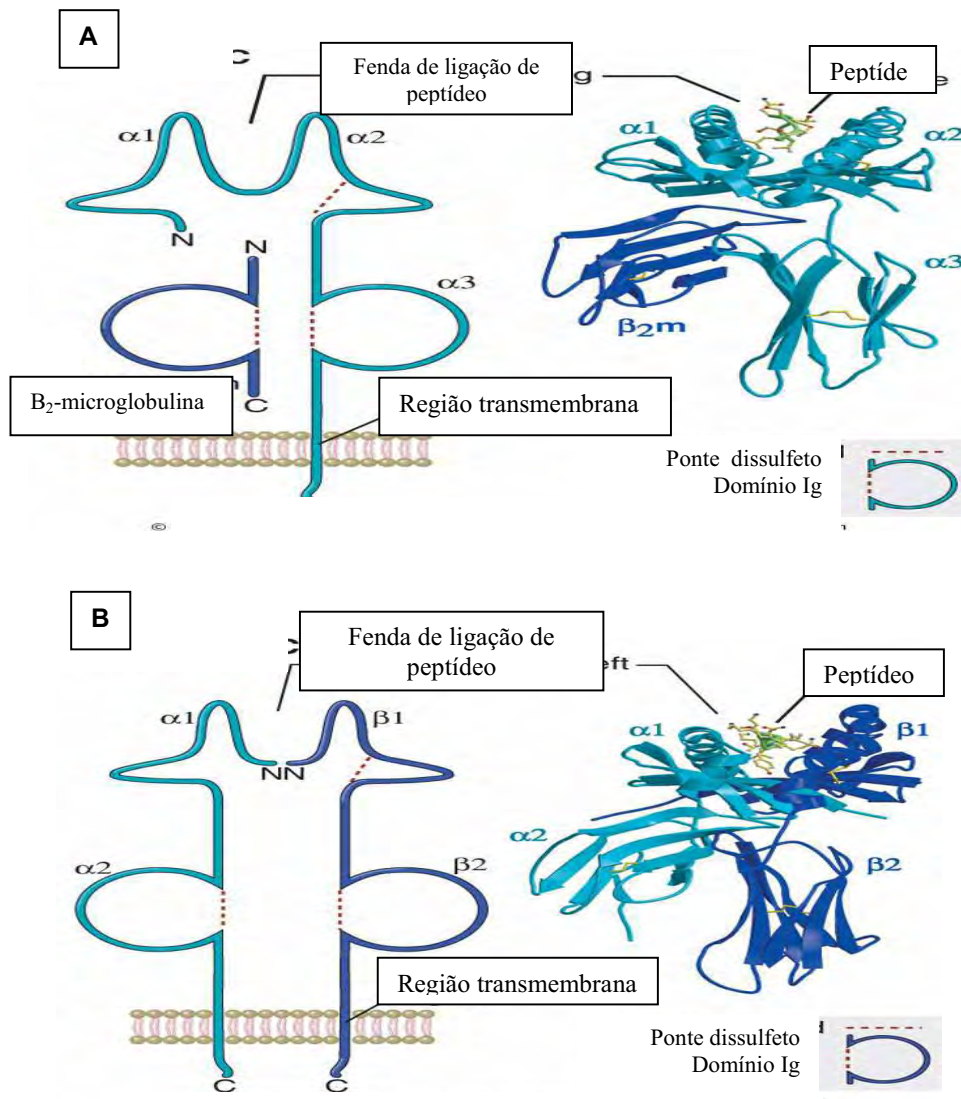


Figura 8: Estrutura da molécula de HLA de classe I (A) e HLA de classe II (B). Adaptado de Abbas 2008.

As moléculas de HLA de classe I são expressas em quase todas as células nucleadas, enquanto as de classe II, em linfócitos T ativados e células apresentadoras de antígenos (CAA), tais como, macrófagos, linfócitos B e células dendríticas (CHOO, 2007). As principais proteínas do HLA de classe II são chamadas DR, DP e DQ, sendo responsáveis pela ativação das células CD4. Os

peptídeos oriundos de antígenos exógenos são apresentados pelo HLA de classe II às células CD4, que uma vez ativados liberam citocinas que se ligam aos receptores dos linfócitos B, os quais se diferenciam em plasmócitos, sendo este o principal evento que permite à célula B tornar-se uma célula produtora de anticorpos (WATTS, 2004).

Similarmente, a apresentação de peptídeos virais e de proteínas endógenas alteradas à células CD8 é realizada pelas moléculas de HLA de classe I (ROCK et al, 2004) (Figura 9). A interação do complexo peptídeo exógeno-HLA de classe II na CAA com o TCR (receptor de célula T) resulta na ativação da célula T, proliferação e produção de citocinas (CRESSWELL, 1994; GERMAIN, 1995; BAKKE & NORDENG, 1995).

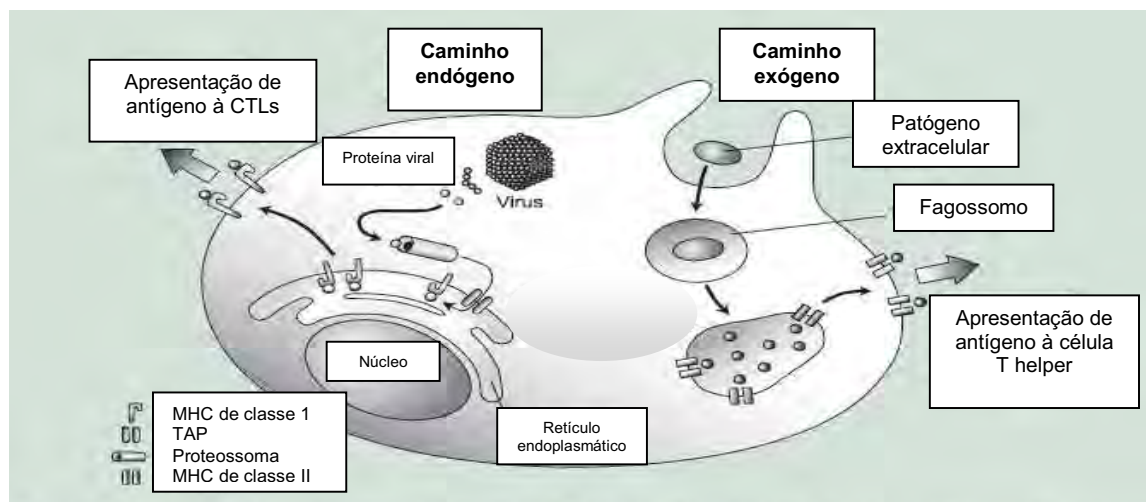


Figura 9: Apresentação de antígeno pela CAA através do caminho endógeno e exógeno. Adaptado de neura.net.

Diversos alelos do gene *HLA-DRB1* já foram observados, com freqüências bastante diferentes. Na população oriental, os alelos mais freqüentes são HLA-

DRB1*0403, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1402, HLA-DRB1*1406, HLA-DRB1*1602, HLA-DRB1*12 e HLA-DRB1*15 (TOKUNAGA, 2001). No Gâmbia, África, o alelo HLA-DRB1*1302 é o mais comum (HILL et al., 1991), já em melanesianos das ilhas de Vanuatu e Nova Caledônia, os alelos HLA-DRB1*15, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*16 constituem 93% dos mais observados, enquanto em povos da América do Norte, Zuni e Tlingit, 32% e 52% respectivamente, apresentam o alelo HLA-DRB1*1402 (SALZANO, 2002).

Na América do Sul, o alelo HLA-DRB1*0403 está presente em 15% dos povos Wayuu, na Colômbia, 10% dos Yukpa, na Venezuela (PETZL-ERLER, 1997) e em 3% dos povos Wichi, Toba e Chiriguano, na região do Chaco, Argentina (PAROLÍN et al., 2009). No Brasil, foi observado o alelo HLA-DRB1*0802 em 50% dos povos Guaranis (PETZEL-ERLER, 1997) e Raingany (TSUNETO, 2003), enquanto num estudo em São Paulo, observaram a combinação de haplótipos tipicamente africanos, HLA-DR18/HLA-DQB1*04. Observaram ainda, o antígeno DR8 em 10% da população e em menos de 35% da população os antígenos DR13 e DR14 (GOLDBERG et al., 1998).

1.4.1. Antígenos leucocitários humano e a malária

A ativação das células CD4 é essencial para o desenvolvimento da imunidade adaptativa contra patógenos (ROSENBERG et al., 1997; JENKINS et al., 2001). As moléculas de HLA de classe II são altamente polimórficas, e este polimorfismo corresponde com diferenças ao longo do peptídeo ligado a sua fenda. Entretanto, a ligação principal derivada da molécula de HLA de classe II é altamente degenerada e

muitos peptídeos diferentes têm sido identificados podendo ligar a múltiplas moléculas de HLA de classe II (CONSOGNO et al., 2003).

Estudos desenvolvidos *in vitro* com *P. falciparum* (SCHWARZER et al., 1998; URBAN et al., 1999), demonstraram que todas as três CAA regulam ambos HLA de classe II e a expressão do CD80 durante a infecção de malária. *Toxoplasma gondii* e *P. falciparum* são capazes de interferir no processamento e apresentação do antígeno derivado do parasito pelo macrófago e células dendríticas, respectivamente (URBAN et al., 1999; LUDER et al., 2001).

O *P. berghei* parece inibir a produção da interleucina-12 (IL-12) pelos macrófagos tão precocemente como um dia pós-infecção (XU et al., 2001). Muitos poucos estudos da interação entre células T CD4 e CAA durante o estágio eritrocítico da infecção da malária tem sido compreendido (LUYENDIK et al., 2002). Urban e colaboradores (1999) observaram que a expressão do HLA de classe II, a expressão de proteínas co-estimulatórias e a habilidade das células dendríticas em apoiar a proliferação das células T foram todas prejudicadas após a endocitose do *P.falciparum*. Em outro estudo, macrófagos de ratos infectados com *P. chabaudi* também demonstravam deficientes na função acessória, não relacionada ao processamento ou apresentação do antígeno, que foi similar à deficiência induzida pela β -hematina, porém, a expressão das proteínas co-estimulatórias não foram examinadas neste estudo (SCORZA et al., 1999).

1.4.2. Antígenos leucocitários humano e vacina contra malária

Estudos anteriores têm descrito associações entre diferenças alélicas nos genes do HLA de classe II e a resposta sorológica nos ensaios de vacinas para a

malária (PATARROYO et al., 1991; NARDIN et al., 2001). Stephens e colaboradores (1995) descreveram acentuada resposta de anticorpos em indivíduos tailandeses vacinados com antígenos de CS de *P.falciparum* e a presença do alelo HLA-DPB1*0501. Ensaio de vacinas utilizando peptídeos antígenos múltiplos (MAP) de esporozoítos de *P.falciparum* têm obtido altos níveis de imunização. Entretanto, essa resposta mostrou-se geneticamente restrita a três alelos do HLA de classe II, sendo eles HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*1101 e HLA-DQB1*0603, os quais são encontrados em aproximadamente 25 a 35% da população dependendo da formação étnica. Por outro lado, o alelo HLA-DRB1*0701 tem sido associado a baixos níveis de resposta de anticorpos (NARDIN et al., 2000).

Em Candeias do Jamari, cidade próxima a Porto Velho, indivíduos expostos à infecção por malária vivax, nenhuma associação significativa, positiva ou negativa, foi observada entre as moléculas de HLA-DR e a resposta de anticorpos para a variante *P.vivax-like*. Entretanto, foi observada associação entre a resposta de anticorpos para VK247 e a presença dos antígenos HLA-DR16 e entre HLA-DR7 e a ausência de anticorpos de resposta para VK210. Dos 108 indivíduos analisados, 58% responderam à DR16 para VK247. As associações entre as respostas de anticorpos contra CSP e o polimorfismo do HLA-DR encontradas não pareceram ser devida à distorção da frequência alélica do HLA na população, pois não houve diferenças na distribuição geral de fenótipos, demonstrando que os epítomos testados evocarão respostas somente em uma porcentagem de indivíduos expostos à infecção por *P. vivax* e que alguns dos padrões são restritos ao HLA. (OLIVEIRA – FERREIRA et al., 2004).

1.5. Justificativa

Os polimorfismos do HLA têm sido associados à variação sorológica nos ensaios de vacinação, no entanto, são poucas as avaliações desses polimorfismos frente à resposta contra antígenos importantes do parasito em populações naturalmente expostas. O AMA-1 tem se mostrado imunogênico e considerado um candidato ao desenvolvimento de uma vacina, no entanto a avaliação da resposta imune humoral contra esse antígeno frente aos polimorfismos do HLA de classe II ainda não foi estabelecida.

Ademais, trabalhos recentes têm mostrado resultados variáveis quanto à sintomatologia e a resposta ao tratamento na malária vivax (KAIN et al., 1993 e MACHADO et al., 2003). A avaliação entre a infecção pelos genótipos variantes de *P. vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) e a resposta imune contra peptídeos do parasito, podem fornecer avanços para compreensão do comportamento da resposta imunológica frente a essas variantes. Além disso, considerações sobre a influência das frequências alélicas do HLA de classe II na modulação da resposta sorológica, contribuirão para compreender variações na imunidade contra os tipos variantes e, a diversidade genética das populações brasileiras, oferecendo novos subsídios para o desenvolvimento de uma possível vacina em populações endêmicas.

1.5.1. Hipótese

Diferenças alélicas no gene *HLA-DRB1* podem modular a resposta imune humoral contra o Antígeno-1 de Membrana Apical nas variantes de *P. vivax* em indivíduos de áreas endêmicas da região Amazônica brasileira.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a relação entre a resposta de anticorpos contra o Antígeno-1 de Membrana Apical nas variantes de *P. vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) e os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* em populações endêmicas da Amazônia brasileira.

2.2. Específicos

- Determinar os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* na população estudada;
- Avaliar a influência das variantes de *P. vivax* no perfil de resposta contra a AMA-1;
- Correlacionar os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* na resposta sorológica para os peptídeos da AMA1 das variantes do *P. vivax* em indivíduos da Amazônia brasileira.

3. Materiais e métodos

3.1. Amostras

As amostras de sangue periférico foram coletadas entre janeiro de 2002 a dezembro de 2004 e estocadas à -20°C no Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

Os indivíduos envolvidos nesse estudo seguiam as seguintes características: idade entre 5 a 66 anos (Tabela 1), gota espessa positiva para *P. vivax* tanto em infecção simples como mista com outra espécie (Tabela 2 e 3) confirmados por diagnóstico molecular, evidência de sintomatologia compatível com a doença e residência por no mínimo 10 anos em área endêmica. Para as análises foram utilizadas 119 amostras de pacientes e 59 controles. No estudo das variantes utilizou-se 86 das amostras de pacientes; na avaliação dos alelos do gene *HLA-DRB1*, foram utilizadas 60 amostras de pacientes, já utilizadas no estudo da CSP de *P.vivax*, que tiveram ao menos 2 episódios anteriores de malária e 29 amostras controle de indivíduos doadores de sangue que procuraram os bancos de sangue para doações, com idade mínima de 18 anos, triados clinicamente, segundo critério nacional de triagem de banco de sangue, portanto, sem sintomas para malária e sem histórico anterior da doença, residentes a pelo menos dez anos na região endêmica. E, para o estudo sorológico da AMA-1, foram utilizadas as 119 amostras de pacientes e 30 amostras de plasma de voluntários residentes no Estado de São Paulo sem contato prévio com a malária a fim de se estabelecer o ponto de corte. Todos os pacientes e responsáveis assinaram termo de consentimento.

Tabela 1: Distribuição do sexo e idade entre os 115 indivíduos estudados.

Sexo	Frequência (%)	Varição de idade (anos)
Homens	73,91	6-64
Mulheres	26,09	5-66

Tabela 2: Resultado da gota espessa do total de 112 indivíduos estudados.

(nº de parasitos/ mm ³)	<1 à 199	200-300	301- 500	501- 10000	10001- 100000
Frequência (%)	15,18	8,03	11,61	63,40	1,78

Tabela 3: Distribuição da quantidade de infecções anteriores entre 98 indivíduos estudados.

Quantidade de infecções	0	1-2	3	+3
Frequência de indivíduos (%)	7,14	36,73	17,35	38,77

3.2. Aspectos éticos

Este é um subprojeto aprovado em 2006 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP dentro do projeto “Genótipos da Proteína Circunsporozoítica de *Plasmodium vivax* associados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade” (CEP/FAMERP nº 3784/2006) (Anexo1).

3.3. Análises Laboratoriais

3.3.1. Extração do DNA

O DNA foi extraído de sangue total periférico de acordo com Pena e colaboradores (1991). Resumidamente, a extração do DNA das amostras microscopicamente positivas pela gota espessa como *P. vivax* e dos doadores,

seguiu o procedimento: em um tubo de polipropileno contendo 1 mL de solução de lise 1 (Figura 10) foram adicionados 300 µL de sangue periférico, coletados em tubo contendo EDTA. Após a homogeneização, o tubo foi centrifugado a 6500 fg durante 5 minutos e, em seguida o sobrenadante desprezado. Então, foi adicionado novamente ao tubo 1 mL de solução de lise 1, e este homogeneizado até o “pellet” ser desfeito com posterior repouso por 5 minutos. O tubo foi centrifugado novamente a 6 500 fg por 5 minutos e o sobrenadante novamente desprezado.

Reagente	Concentração	Quantidade
Sacarose	0,32M	10,92g
Tris HCl	10mM	1mL
MgCl₂	5mM	0,5mL
Triton (Octil Fenol Etoxilato)	1% 100X	1mL
Água mili-Q		q.s.p.100mL

Figura 10: Reagentes utilizados na solução de lise 1.

Em seguida, o precipitado obtido foi dissolvido em 450 µL de solução de lise 2 (Figura 11) , 25 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL) e homogeneizado a seguir. Feito isso, a amostra ficou incubada em banho-maria por 3 horas a 42 °C. Após a incubação, novos procedimentos foram realizados para a desproteinização da amostra. Adicionou-se 500 µL de fenol ao tubo, que foi homogeneizado por inversão, seguido da centrifugação por 5 minutos a 7 000 fg.

Reagente	Concentração	Quantidade
NaCl	0,075M	2,19g
EDTA (pH8,0)	0,02M	20mL
Água mili-Q	-	q.s.p. 500mL

Figura 11: Reagentes utilizados no preparo da solução de lise 2.

Organizou-se uma segunda série de tubos, para os quais foi transferido o sobrenadante da primeira série, sendo então adicionados 500 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram homogeneizados e submetidos a nova centrifugação por 5 minutos a 7000 fg. Este último procedimento foi repetido mais uma vez. Para a precipitação do DNA, o sobrenadante foi transferido para outros tubos contendo 50 μ L de KCl 2M gelado, ao qual foram adicionados 500 μ L de etanol também gelado. Os tubos foram invertidos várias vezes até o DNA precipitar, sendo então centrifugados por 30 segundos a 13000 fg. Os sobrenadantes foram desprezados e aos tubos foram adicionados 200 μ L de etanol 70% gelado. Uma nova centrifugação foi efetuada por 30 segundos a 13 000 fg. Cuidadosamente, os sobrenadantes foram desprezados e os tubos mantidos abertos para secagem por 15 minutos. Por fim o DNA foi hidratado com 100 μ L de tampão T.E. (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; Água Mili-Q q.s.p. 100 mL) sendo posteriormente armazenados a -20 °C até o momento de uso.

3.3.2. Genotipagem da CSP das variantes de *P. vivax*

Foi utilizado um sub-grupo de 86 amostras analisadas em Storti-Melo e colaboradores (2009), no qual detectou-se infecções simples e mistas com os três genótipos estudados, exceto para a combinação dos genótipos VK247 com *P. vivax-like*. A tabela 4 informa a distribuição dos genótipos da CS do *P. vivax* incluídos no estudo.

Tabela 4: Frequência das variantes nas amostras analisadas.

Variante da CSP	Presença da variante CSP na amostra (n=86)	Frequência (%)
VK210	39	45,35
VK247	4	4,65
<i>P. vivax-like</i>	18	20,93
VK210 + VK247	13	15,12
VK210 + <i>P. vivax-like</i>	8	9,30
VK210 + VK247 + <i>P. vivax-like</i>	4	4,65

3.3.3. Identificação dos polimorfismos do gene *HLA-DRB1*

Um subgrupo de 60 amostras de indivíduos maláricos foi selecionado, tendo como critério média de três episódios prévios de infecção, para genotipagem do gene *HLA-DRB1* realizada pelo método de PCR-SSP (Micro SSP™ DNA Typing Trays, One Lambda, Inc, Estados Unidos da América). Resumidamente, na placa fornecida pelo *kit*, foi adicionado 1µL de água mili-Q nos poços H1, H4, H7 e H10, os quais são os controles de contaminação. No DMix, também fornecido pelo fabricante, foi adicionado 1,5 µL de Taq polimerase (5U/ µL) e homogeneizado, em seguida, nos poços controle de contaminação foram adicionados 9 µL dessa mistura.

Foi adicionado ao DMix então, 29 µL das amostras de DNA a uma concentração de 100µg/ mL e homogeneizado. 10 µL da mistura foram adicionadas em cada poço, exceto nos poços controle. A placa foi vedada com etiqueta adesiva identificando cada amostra e colocada no termociclador Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700 com os seguintes ciclos: 1º ciclo de 96°C por 2 minutos e 10 segundos, seguidos por 1 minuto a 63°C; o 2º ciclo repetido 9 vezes foi de 10 segundos a 96°C mais 1 minuto a 63°C e um 3º ciclo repetido 20 vezes em 96°C por 10 segundos, 59°C por 50 segundos e 72°C por 30 segundos. O último ciclo foi de 4°C infinito. Os resultados da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

3.3.4. Avaliação Sorológica da AMA-1

A análise da resposta sorológica foi realizada por teste imunoenzimático, ELISA, para pesquisa de anticorpos IgG contra o Antígeno-1 de Membrana Apical de *P. vivax* (PvAMA1), segundo Rodrigues e et al., (2005). A síntese dos peptídeos e as análises foram realizadas sob a colaboração da Profa. Dra. Irene Soares na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-SP. Resumidamente, a avaliação foi da seguinte forma: a princípio, o gene *pvama-1* foi clonado e seqüenciado. Em seguida, a proteína His₆ – AMA1 foi expressa em *Escherichia coli*. Os corpos de inclusão foram solubilizados a partir do sedimento contendo as bactérias lisadas, de acordo com Saini e colaboradores (2002). A proteína His₆ -AMA1 foi purificada para ser utilizada na sensibilização das placas de ELISA. As microplacas para ELISA, 96-poços, foram sensibilizadas *overnight* em temperatura ambiente com 200ng/poço da proteína recombinante His₆ -AMA1. As placas foram lavadas com tampão PBS +

0,05% Tween 20 e posteriormente, bloqueadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS) por 2 horas à 37°C. Após a lavagem das placas com PBS-Tween 20, as amostras foram diluídas na concentração de 1:100 em solução de PBS/1.5% leite desnatado e 50 mL de cada amostra foi adicionado em duplicata a cada poço. Após incubação de 2 horas à temperatura ambiente as placas foram lavadas com PBS-0,05% Tween 20 e adicionados 50 mL da solução de anti-IgG humano conjugado com peroxidase na diluição de 1:10000 (Sigma) em cada poço. A reação enzimática se deu através da adição de 1 mg/mL de dihidroclorido de fenilendiamina (OPD) (Sigma) diluído em tampão citrato-fosfato, pH 5,0 contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio e foi interrompida pela adição de 50 µl de 4 N H₂SO₄. A densidade óptica foi obtida em leitor de ELISA (SLT SPECTRA, SLT Labinstruments, Austria) a 492 nm. O ponto de corte foi obtido através da média da densidade óptica (DO) de 30 amostras de indivíduos doadores de sangue provenientes do Estado de São Paulo que nunca tiveram contato prévio com malária, acrescida de três desvios padrão. Os resultados foram expressos como índice de reatividade (IR), o qual foi calculado dividindo-se a DO da amostra teste pelo valor de ponto de corte. Valores do IR > 1,0 foram considerados como positivos.

3.4. Análises Estatísticas

Foram realizadas análises utilizando o software de estatística R versão 2.4 (Copyright 2006 The R Foundation For Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0). Para obtenção de independência entre as proporções foi aplicado o teste exato de Fisher e alternativamente o teste do qui-quadrado com nível de significância para o valor de $p < 0,05$ (BEIGUELMAN, 1994).

4. Resultados

4.1. Frequência dos alelos do gene *HLA-DRB1* nas amostras analisadas

Como sumarizado na tabela 5, no total de amostras de DNA estudadas (n=89), verificou-se a presença de 13 alelos do gene *HLA-DRB1* nos indivíduos provenientes da região Norte do Brasil. Entre estes, o alelo HLA-DRB1*04 (0,174) foi o mais freqüente seguidos pelos alelos HLA-DRB1*08 (0,129) e DRB1*13 (0,112). Os alelos menos freqüentes foram os HLA-DRB1*09 e DRB1*12.

Na extratificação por grupos maláricos e não maláricos, observou-se que os alelos HLA-DRB1*04 (0,192), DRB1*07 (0,142) e DRB1*08 (0,125) foram os mais freqüentes no grupo de maláricos, enquanto que os menos freqüentes neste grupo foram os alelos HLA-DRB1*12 (0,008), DRB1*16 (0,033), DRB1*10 e DRB1*15 (0,042). No grupo não-maláricos, os alelos mais observados foram HLA-DRB1*04, DRB1*08, DRB1*13 (0,138) e DRB1*03 (0,103), enquanto que os alelos HLA-DRB1*07, DRB1*12 (0,017), DRB1*09 e DRB1*11 (0,034) foram os menos freqüentes. O alelo HLA-DRB1*09 esteve presente somente no grupo controle (não-maláricos). Houve diferença estatística entre as frequências observadas para o alelo HLA-DRB1*07 entre os dois grupos estudados (Teste Qui-quadrado, $p=0,0206$).

Tabela 5: Freqüência alélica do gene *HLA-DRB1* nos indivíduos maláricos e não-maláricos provenientes da Amazônia brasileira.

HLA-DRB1*	Freqüência alélica Total (n=89)	Freqüência alélica no grupo maláricos (n=60)	Freqüência alélica no grupo não-maláricos (n=29)
Alelos			
01	0,079	0,083	0,069
03	0,101	0,100	0,103
04	0,174	0,192	0,138
07 ⁺	0,101	0,142	0,017
08	0,129	0,125	0,138
09	0,011	0,000	0,034
10	0,045	0,042	0,052
11	0,051	0,058	0,034
12	0,011	0,008	0,017
13	0,112	0,100	0,138
14	0,079	0,075	0,086
15	0,056	0,042	0,086
16	0,051	0,033	0,086

⁺ Teste Qui-quadrado, p=0,0206.

As freqüências alélicas do gene *HLA-DRB1*, do grupo maláricos, foram associadas às infecções simples causadas pelos genótipos da CS de *P. vivax*. Dentre os indivíduos com infecção pelo genótipo VK210 (n= 32), o alelo HLA-DRB1*07 (0,172) foi o mais observado, enquanto que os alelos HLA-DRB1*15 e HLA-DRB1*16 foram os menos freqüentes (0,017) e o alelo HLA-DRB1*12 não foi detectado. Nas infecções pelo genótipo VK247 (n=3), pode-se verificar uma

distribuição idêntica (0,167) para os alelos HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*13 e HLA-DRB1*15. Nos indivíduos com infecção simples pelo *P.vivax-like* (n=8) o alelo HLA-DRB1*04 foi o mais freqüente (0,187) e os alelos HLA-DRB1*12 e HLA-DRB1*13 não foram detectados. A associação dos alelos e as infecções mistas não forneceram informações relevantes. Não houve nenhuma relação significativa entre a associação da presença destes alelos do gene *HLA-DRB1* e a infecção pelos genótipos da CS de *P.vivax* (teste exato de Fisher, $p>0,05$).

4.2. Resposta imunológica de anticorpos IgG contra o AMA-1 na Amazônia Brasileira.

O IR, índice de reatividade, é dado pelo valor da densidade óptica da amostra teste, em comprimento de onda de 492 nm (OD_{492}), dividido pelo valor do ponto de corte. Os valores de $IR>1$ são considerados positivos e $IR\geq 10$ altamente responsivos. Foram analisadas 119 amostras de plasma de indivíduos maláricos para a presença de anticorpos IgG contra AMA-1 e como apresentado na tabela 6, observou-se resposta para esse peptídeo em 89,08% das amostras, sendo que 15,13% apresentaram $IR \geq 10$ e 10,92% não obtiveram resposta frente a esse peptídeo; $IR<1$.

Tabela 6: Freqüência e nível de anticorpos IgG para AMA-1 no soro de indivíduos infectados da região Norte do Brasil.

IR	<1 (n=13)	≥ 1 e <10 (n=88)	≥ 10 (n=18)
Freqüência (%)	10,92	73,95	15,13
Média	0,48	6,82	10,12

Os dados mostraram uma associação positiva significativa entre o nível de anticorpos e a quantidade de episódios anteriores de malária (Teste Exato de Fisher, $p < 0,05$; Figura 15). Dentre os indivíduos que apresentaram $IR \geq 10$ a maioria (81,25%) teve pelo menos três episódios prévios de malária, enquanto 12,50% tiveram de 1 à 2 episódios anteriores e 6,25% estavam em sua primeira infecção. Dos indivíduos com $IR \geq 1$ e < 10 foram observados em 54,79% destes três ou mais episódios de malária. No entanto, em 41,10%, apresentaram de um a dois episódios anteriores e 4,11% estavam em sua primeira infecção. Entre os indivíduos que não responderam ($IR < 1$), 22,22% tiveram três ou mais episódios de malária, 44,44%, um ou dois episódios e 33,33% eram primo-infectados.

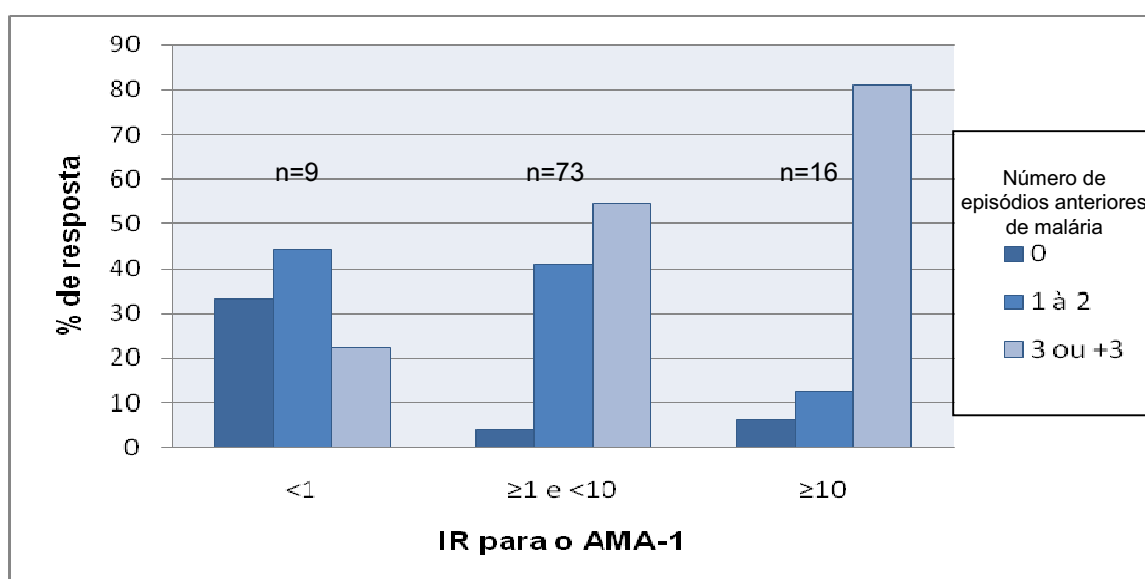


Figura 12: Frequência de resposta à AMA-1 de acordo com o nível anticorpos e quantidade de episódios de malária anteriores. (Teste exato de Fisher, $p < 0,05$).

Associação entre a resposta de anticorpos contra AMA-1 e infecções causadas pelos genótipos CS de *P. vivax* foi analisada em um sub-grupo de 86 amostras (Tabela 7). Não foram observadas associações significativas na frequência

de respondedores entre os diferentes genótipos da CS detectados, exceto para infecções simples pelo genótipo VK210 e indivíduos com $IR \geq 10$ (30,77%; $p = 0,037$ - teste Exato de Fisher).

Tabela 7: Freqüência (%) de resposta de anticorpos contra o AMA1 em indivíduos infectados pelos genótipos de *P.vivax*.

IR para AMA-1	1 (n=39)	2 (n=4)	3 (n=18)	1+2 (n=13)	1+3 (n=8)	1+2+3 (n=4)
< 1	7,69	25,00	5,56	-	12,50	25,00
≥ 1 e <10	61,54	75,00	94,46	92,31	62,50	50,00
≥ 10	30,77*	-	-	7,69	25,00	25,00

1: *P.vivax* (VK210); 2: *P.vivax* (VK247); 3: *P.vivax-like*.

* Teste Exato de Fisher, $p=0,037$).

4.3. Associação entre a resposta de anticorpos contra AMA-1 e a presença dos alelos HLA-DRB1.

A freqüência alélica dos polimorfismos do *HLA-DRB1* dos indivíduos maláricos foi comparada com níveis de anticorpos IgG contra AMA-1 (Tabela 8). Nos indivíduos que apresentaram $IR \geq 10$, os alelos mais freqüentes foram HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*07 e HLA-DRB1*13 (0,182), enquanto os com menor freqüência foram HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*10 e HLA-DRB1*11 (0,045), sendo que o HLA-DRB1*12, HLA-DRB1*15 e HLA-DRB1*16 estavam ausentes neste grupo de indivíduos. Entre os indivíduos com $IR \geq 1$ e <10 os alelos mais freqüentes foram HLA-DRB1*04 (0,186), HLA-DRB1*07 (0,151) e HLA-DRB1*08 (0,128), enquanto que os menos freqüentes foram os alelos HLA-DRB1*12 (0,012), HLA-DRB1*10, HLA-DRB1*15 e HLA-DRB1*16 (0,047). Entre os indivíduos que não desenvolveram resposta de anticorpos, os alelos mais freqüentes foram HLA-DRB1*04 (0,333), seguido pelos

alelos HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*03 e HLA-DRB1*08 (0,167). Menores freqüências foram observadas para HLA-DRB1*13 e HLA-DRB1*15, que apresentaram freqüência alélica de 0,083. Ademais, os alelos HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*10, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*12, HLA-DRB1*14 e HAL-DRB1*16 não estavam presentes neste grupo. Nenhuma associação significativa foi observada entre a presença dos alelos do gene *HLA-DRB1* e a resposta IgG contra o AMA-1 (Teste Exato de Fisher, $p > 0,05$).

Tabela 8: Freqüência alélica do gene *HLA-DRB1* com a resposta para porção His₆ – AMA1.

HLA-DRB1*	IR < 1 (n=12)	1 ≤ IR < 10 (n=86)	IR ≥ 10 (n=22)
01	0,167	0,081	0,045
03	0,167	0,070	0,182
04	0,333	0,186	0,136
07	-	0,151	0,182
08	0,167	0,128	0,091
10	-	0,047	0,045
11	-	0,070	0,045
12	-	0,012	-
13	0,083	0,081	0,182
14	-	0,081	0,091
15	0,083	0,047	-
16	-	0,047	-

Teste Exato de Fisher, $p > 0,05$.

5. Discussão

Apesar de diversas tentativas de controle, a malária ainda continua sendo uma doença com alta prevalência e elevado índice de mortalidade (COWMAN & CRABB, 2006), resultando em um milhão de mortes no mundo a cada ano (CDC, 2009). No Brasil já foram registrados cerca de 600 mil casos, mas hoje esse quadro vem mudando, os casos notificados estão diminuindo, isso devido a intervenções do governo no combate e prevenção a esta doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A malária causada pelo *P. vivax* é responsável por cerca de 80% dos casos brasileiros, e os genótipos da CS deste parasito foram detectados tanto em infecções simples quanto mistas (STORTI-MELO, et al., 2009). Embora a infecção por esta espécie dificilmente acarrete a morte do paciente, ela causa morbidade e perdas sócio-econômicas relevantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de criar uma vacina contra a malária. Das proteínas estudadas, os antígenos localizados em organelas apicais do merozoíto têm sido caracterizados como alvos para proteção ou como candidatos à vacina (MILLER et al., 2002). Dentre as várias proteínas do estágio sangüíneo, a AMA-1 é considerada um importante antígeno candidato (WATERS et al., 1990; HEHL et al., 2000; GAFFAR et al., 2004). A PvAMA-1, nas cepas circulantes no Brasil, é extremamente conservada e, por seu limitado polimorfismo, mostra-se imunogênica, sendo capaz de induzir alta resposta de anticorpos durante a infecção natural (SOARES et al., 1999; RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006). Além disso, especula-se que a presença de anticorpos

contra AMA-1 em indivíduos tratados profilaticamente, pode extinguir o parasito antes de sua detecção na gota espessa (MORAIS et al., 2006).

Não apenas os antígenos expostos pelo parasito são capazes de modular a resposta de anticorpos, mas também as características do sistema imunológico do hospedeiro. Com isso, diversos estudos têm demonstrado que as moléculas do HLA podem ser capazes de modular a resposta que o indivíduo irá desenvolver frente a um microrganismo (PATARROYO et al., 1991; STEPHENS et al., 1995; NARDIN et al., 2000; NARDIN et al., 2001; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004). No estudo proposto, avaliou-se a relação entre a resposta de anticorpos contra o AMA-1, nas infecções causadas pelas variantes do *P. vivax* e, os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* em populações endêmicas da Amazônia brasileira.

Nossos resultados evidenciam que os alelos HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*08 e HLA-DRB1*13 são os mais prevalentes nesta população. A frequência destacada do alelo HLA-DRB1*04 neste trabalho, está de acordo com dois estudos prévios em populações ameríndias (SALZANO, 2002; PAROLÍN & CARNESE, 2009), nos quais este alelo foi mais comum entre ameríndios da América do Sul. Além disso, a alta frequência observada tanto no grupo de indivíduos maláricos quanto nos não-maláricos evidencia que este alelo não está relacionado à susceptibilidade ou proteção à infecção por *P. vivax*. Sua alta frequência é característica de populações ameríndias da América do Sul (SALZANO, 2002; PAROLÍN & CARNESE, 2009) e, este fato reflete a influência deste grupo étnico no processo de miscigenação da população brasileira, especialmente na região Norte do país (ZAGO, 2000).

Em 2004, Oliveira-Ferreira e colaboradores sugeriram que o alelo HLA-DRB1*07 estava relacionado ao perfil de ausência de resposta de anticorpos para a

porção repetitiva da CSP na VK210 e, que o alelo HLA-DRB1*16 estava relacionado ao perfil de bom respondedor para a seqüência repetitiva da CSP de VK247. Interessantemente, nosso estudo mostra que o alelo HLA-DRB1*07 foi um dos mais freqüentes (0,172) entre os indivíduos com infecção simples pela VK210, e entre os indivíduos infectados pela variante VK247, o alelo HLA-DRB1*16 esteve ausente. Apesar de não termos encontrado associação significativa entre as freqüências alélicas do HLA e os genótipos da CS de *P. vivax*, esta foi observada entre os grupos maláricos e não maláricos. Portanto, podemos pensar que a maior freqüência observada do alelo HLA-DRB1*07 entre os indivíduos maláricos possa sugerir uma susceptibilidade às infecções pela VK210 nos indivíduos que expressam esse alelo e, esse fato, talvez represente um dos fatores que tenham favorecido a ampla distribuição dessa variante na região Norte do Brasil. Ademais, estudos prévios com vacinas virais (DESOMBERE et al., 1998; POLLAND, 1999; GELDER et al., 2002) e ensaios de vacinação com a CSP de *P. falciparum* (NARDIM et al., 2000) evidenciaram que a expressão do alelo HLA-DRB1*07 esta relacionada a falha no desenvolvimento de resposta imunológica. Embora, nossos resultados apontem para uma relação importante entre o alelo HLA-DRB1*07 e a malária vivax na Amazônia brasileira, essas inferências necessitam de maiores investigações. Além disso, novos estudos avaliando esse perfil frente às variantes da CS devem ser realizados, em virtude do tamanho amostral limitado deste trabalho para os demais genótipos.

Já foi demonstrado que os níveis de anticorpos contra peptídeos PvAMA-1 estão relacionados à intensidade de exposição em áreas com baixa a moderada transmissão de malária no Brasil (MORAIS et al., 2006), e ainda que o PvAMA-1 é fortemente imunogênico em todos os indivíduos expostos a múltiplos episódios de

infecção (RODRIGUES et al., 2005). Além disso, estudo recente, com indivíduos infectados pelo *P. falciparum*, demonstrou que a resposta de anticorpos IgG1 contra o PfAMA-1 está associada à baixa incidência de malária clínica no Oeste da África (NEBIE et al., 2008). Por outro lado, um estudo com crianças africanas, não encontrou evidências da associação entre os níveis de anticorpos IgG contra o PfAMA-1 e a incidência de malária (DODOO et al., 2008). A análise da resposta imunológica para os três domínios (DI, DII e DIII) do PfAMA-1, evidenciou títulos de anticorpos igualmente altos em teste de ELISA para todos eles. Entretanto, somente anticorpos desenvolvidos por coelhos imunizados com um construto incluindo os domínios DI+DII puderam significativamente inibir o crescimento do parasito *in vitro* (TALITHA et al., 2004). Este resultado mostra ser bastante claro que o AMA-1 é um antígeno altamente imunogênico, tanto para o *P. vivax* (RODRIGUES, et al., 2005; MORAIS et al., 2006), quanto para o *P. falciparum* (TALITHA et al., 2004; NEBIE et al., 2008), porém ainda não se sabe qual o nível de anticorpos necessário para proteger o indivíduo da malária.

Em nosso estudo, 89,08% dos indivíduos vivendo em área endêmica para malária desenvolveram algum nível de resposta IgG contra o AMA-1, e desse grupo, 15,13% desenvolveram resposta de anticorpos em altos níveis contra o peptídeo estudado, IR ≥ 10 . A resposta de anticorpos foi crescente de acordo com o aumento da exposição ao parasito, corroborando com dados descritos previamente na literatura (RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006). Quando comparamos o nível de resposta desenvolvida frente ao AMA-1 com a variante da CS a qual o indivíduo foi infectado, observamos que independente da variante, ou ainda do tipo de infecção (simples ou mista), uma alta frequência de respondedores ao antígeno.

Entretanto, nas infecções simples pela variante VK210 observou-se uma significativa maior resposta de anticorpos em altos níveis ($p=0,037$) em relação às demais infecções; tanto nas infecções simples pelas variantes VK247 e *P. vivax-like*, quanto nas diferentes infecções mistas. Um fato a ser considerado é que a VK210 é a forma clássica e mais prevalente na Amazônia brasileira e, portanto, os indivíduos podem estar mais expostos a esta variante (STORTI-MELO, et al., 2009), o que explicaria os altos níveis de resposta nas infecções por esta variante.

Diversos trabalhos têm investigado a predisposição ou a influência do HLA na patogênese de doenças infecciosas. Estudos populacionais têm sugerido associação dos antígenos HLA com a susceptibilidade ou resistência à lepra (TODD, et al., 1990), leishmaniose tegumentar (PETZL-ERLER et al., 1991) e hepatoesplenomegalia na esquistossomose (ASSAAD-KHALIL et al., 1993). Os primeiros relatos da associação do polimorfismo do HLA com a resposta imunológica à malária foram em 1991, onde Hill e colaboradores observaram que em crianças do oeste africano os alelos HLA-Bw53, HLA-DRB1*1302 e HLA-DQB1*0501 estavam associados à proteção contra malária grave por *P. falciparum*. Posteriormente, Banic e colaboradores (2002), relataram um predomínio de resposta positiva para o peptídeo Nt47 de *P. falciparum* entre indivíduos portadores do HLA-DR4, entretanto não foi observada nenhuma associação entre os alelos HLA-DQB1. Recentemente, observou-se que indivíduos africanos portadores do gene HLA-DRB1*1201, desenvolviam maior nível de anticorpos contra AMA-1 para a cepa 7G8 de *P. falciparum*. Essa associação esteve relacionada ao nível, mas não à taxa de aquisição de anticorpos anti-AMA-1 (JOHNSON et al., 2004). Apesar das associações prévias descritas para *P. falciparum*, nossos dados não mostraram que

os alelos HLA-DRB1 influenciem na aquisição de resposta e nem mesmo nos níveis de anticorpos contra AMA-1 de *P. vivax*. No entanto, devemos lembrar que a molécula de AMA-1 é caracterizada como altamente imunogênica (RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006), sendo reconhecida por quase 90% dos indivíduos infectados, esse fato dificulta a identificação de uma possível associação dos alelos HLA e aquisição de anticorpos anti-AMA-1. A falta de associação observada nesse estudo pode realmente ser devido à ausência de modulação do *HLA-DRB1* na resposta humoral contra esse peptídeo, mas devemos levar em consideração a casuística reduzida deste trabalho. Finalmente, estudos futuros incluindo populações primo-infectadas e ainda ensaios funcionais da interação desses antígenos poderiam trazer esclarecimentos importantes para os ensaios de vacinação incluindo essa proteína.

6.CONCLUSÃO

Nas amostras estudadas:

- O gene *HLA-DRB1* apresenta uma distribuição heterogênea na população estudada, evidenciando uma contribuição característica de descendência ameríndia.
- As variantes da proteína CS de *P.vivax* parecem não influenciar no desenvolvimento de anticorpos, pelo hospedeiro, contra a AMA-1.
- Não há evidências de que os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* interfiram no desenvolvimento de resposta de anticorpos contra o AMA-1 na malária vivax na Amazônia brasileira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.H. et al. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell**, v.63, n.1, p.141-153, 1990.

ADAMS, J.H. et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.89, p.7085-9, n.15, 1992.

ALONSO, P.L. et al. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomized controlled trial. **Lancet**, v.366, n.9205, p.2012-2018, 2005.

ALVES, R.T. et al. A new PCR-RFLP protocol for *Plasmodium vivax* CSP genotype (VK210, VK247 and *P.vivax-like*) determination. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.59, n.4, p.415-419, 2007.

ANDERS, R.F. et al. Immunization with recombinant AMA1 protects mice against infections with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine**, v.16, n.2-3, p.240-247, 1998.

ARAVIND, L. et al. *Plasmodium* biology: genomic gleanings. **Cell**, v.115, n.7, p.771-785, 2003.

ARNOT, D. E. et al. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science**, v. 230, n.4727, p. 815-818, 1985.

ARRUDA, M. et al. Prevalence of *Plasmodium vivax* variants VK247 and *Plasmodium vivax-like* human malaria: a retrospective study in indigenous Indian populations of the Amazon region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.92, p.628, 1998.

ARRUDA, M.E. et al. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.3, p.367-371, 2007.

ASSAAD-KHALIL, SH. et al. Some genetic, clinical and immunologic interrelations in schistosomiasis mansoni. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.51, n.6, p.619-26, 1993.

BAKKE, O.; NORDENG, T.W. Intracellular traffic to compartments for MHC class II peptide loading: signals for endosomal and polarized sorting. **Immunological Reviews**, v.172, p.171- 187, 1995.

BANNISTER, L.H.; DLUZEWSKI, A.R. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. Blood Cells, v.16, n.2-3, p.257-292, 1990.

BANNISTER, L.H. et al. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. **Journal of Cell Science**, v.116 (Pt18), p.3825- 3834, 2003.

BARANOVA, Y.A. et al. Role of the major histocompatibility complex class II transmembrane region in antigen presentation and intracellular trafficking. **Immunology**, v.111, n.2, p.165-172, 2004.

BARBEDO, M.B. et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.3, p.335-339, 2007.

BARR, P.J. et al. Expression in yeast of a *Plasmodium vivax* antigen of potential use in a human malaria vaccine. **The Journal of Experimental Medicine**, v.165, n.4, p.1160-1171, 1987.

BASTOS, M.S. et al. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. Clinical and Vaccine Immunology, v.14, n.10, p.1249-1259, 2007.

BAUR, M.P.; DANILOVS J.A. Populations analysis of HLA-A, B, C, DR and others genetic markers. **UCLA Tissue Typing Laboratory Histocompatibility Testing**, ed. Terasaki, P.I., Los Angeles, p.955-1210, 1980.

BECK, S.; TROWSDALE, J. The human major hitocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. **Annual Review of Genomics and human Genetics**, v.1, p.117-137, 2000.

BEENSON, J.G.; CRABB, B.S. Towards a vaccine against *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Medicine**, v.4, n.12, p.1862-1864, 2007.

BEIGUELMAN, B. Dinâmica dos gene nas famílias e nas populações. Ribeirão Preto, **Sociedade Brasileira de Genética**, p.179-202m 1994.

BLACKMAN, M.J. et al. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red blood cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v.172, n.1, p.379-382, 1990.

BLACKMAN, J.A.; HOLDER, A.A. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.50, n.2, p.307-315, 1992.

BONILLA, J.A. et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Pvcsp and Pvmsp1 in Guyana, South America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.5, p.830-835, 2006.

BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.F. *Plasmodium* – Malária. In: Neves, D.P. et al. **Parasitologia Humana**, Ed. 11^a – São Paulo. Editora Atheneu, 2005, p.143-161.

BRANQUINHO, M.S. et al. Infection of *Anopheles* (Kerteszia) *cruzii* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Jujutiba, São Paulo. **Pan American Journal of Public Health**, v.2, n.3, p.189-193, 1997.

BRODSKYN, C.L.; DeKREY, G.K.; TITUS, R.G. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. **Infection and Immunity**, v.69, n.2, p.665- 672, 2001.

BUENO, L.L. et al. Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-1₁₉ on the innate immune response. *Vaccine*, v.26, n.9, p.1204-1213, 2008.

BURNS, J.M. et al. A protective monoclonal recognizes a variant-specific epitope in the precursor of the major merozoite surface antigen of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. **Journal of Immunology**, v.142, n.8, p.2835-2840, 1989.

CAVASINI, C.E. et al. Plasmodium vivax infection among Duffy Amazon region : An exception ? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, n.10, p.1042-4044, 2007.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION – **CDC** : Malaria : History. Disponível em <<http://www.cdc.gov/malaria/>> .Acesso em 19 de Dezembro de 2008.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION – **CDC** : Malaria : Impact of malaria. Disponível em <<http://www.cdc.gov/malaria/>> .Acesso em 31 de Janeiro de 2009.

CERAVOLO, I.P. et al. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein in an area with unstable malaria transmission. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.67, n.3, p.270-278, 2008.

CHAPPEL, J.A.; HOLDER, A.A. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.60, n.1, p.303-312, 1993.

CHELIMO, K. et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens vary by age and antigen in children in a malaria-holoendemic area of Kenya. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v.24, n.8, p.604-608, 2005.

CHENG, Q.; SAUL, A. Sequence analysis of the apical membrane antigen I (AMA-I) of *Plasmodium vivax*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.65, n.1, p.183-187, 1994.

CHITNIS, C.E.; MILLER, L.H. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v.180, n.2, p.497-506, 1994.

CHITNIS, C.E.; BLACKMAN, M.J. Host cell invasion by malaria parasites. Parasitology Today, v.16, n.10, p.411-416, 2000.

CHOO, S.Y. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing and clinical implications. **Yonsei Medical Journal**, v.48, n.1, p.11-23, 2007.

CHUNG, J.Y.; CHUN, E.H.; KHO, W.G. Analysis of the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 gene from re-emerging Korean isolates. **Parasitology Research**, v.90, n.4, p.325-329, 2003.

COCHRANE, A.H. et al. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, n.5, p.222-223, 1990.

COLLINS, W.E. et al. Immunization of *Saimiri sciureus boliviensis* with recombinant vaccines based on the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.40, n.5, p.455-464, 1989.

COLLINS, W.E. et al. Protective immunity induced in squirrel monkey with recombinant apical membrane antigen 1 of *Plasmodium fragile*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.51, n.6, p.711-719, 1994.

CONSOGNO, G. et al. Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3. **Blood**, v.101, n.3, p.1038-1044, 2003.

CONWAY, D.J. et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. **Nature Medicine**, v.6, n.6, p.689-692, 2000.

CONWAY, D.J.; POLLEY, S.D. Measuring immune selection. **Parasitology**, v.125, p.3- 16, 2002. Supplement.

CONWAY, D.J. Molecular epidemiology of malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.1, p.188-204, 2007.

CORNEJO, O.E.; ESCALANTE, A.A. The origin and age of *Plasmodium vivax*. Trends in Parasitology, v.22, n.12, p. 558-563, 2006.

COWMAN, A. F.; CRABB, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell, v.124, n.4, p.755-766, 2006.

CRESSWELL, P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. **Annual Review of immunology**, v.12, p.259-293, 1994.

CREWETHER, P.E. et al. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. **Infection and Immunity**, v.63, n.8, p.3310-3317, 1996.

CURADO, I.I. et al. Serological investigation of human *Plasmodium vivax-like* malaria in several localities in the State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.284, 1995. Supplement I.

DALY, T.M.; LONG, C.A. The humoral immune response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. **Journal of Immunology**, v.155, n.1, p.236-243, 1995.

DEANS, J.A. et al. Rat monoclonal antibodies which inhibit the *in vitro* multiplication of *Plasmodium knowlesi*. **Clinical and Experimental Immunology**. v.49, n.2, p.297-309, 1982.

DEANS, J.A. et al. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66kD merozoite antigen. **Parasite Immunology**, v.10, n.5, p.535- 552, 1988.

DE CASTRO, M.C.; SINGER, B.H. Was malaria present in the Amazon before the European conquest? Available evidence and future research agenda. **Journal of Archaeology Science**, v.32, p.337-340, 2005.

DESOMBERE, I; WILLEMS, A.; LEROUX-ROELS, G. Response to hepatitis B vaccine: multiple HLA genes are involved. **Tissue Antigens**, v.6, p.593-604, 1998.

DICKO, A. et al. Impact of a *Plasmodium falciparum* AMA-1 vaccine on antibody responses in adult malians. **Plos ONE**, v. 2, n.10, p.e1045, 2007.

DICKO, A. et al. Phase 1 study of a combination AMA 1 blood stage malaria vaccine in malian children. **Plos ONE**, v.3, n. 2, p.e1563, 2008.

DODOO, D. et al. Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP1₁₉, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. **Malaria Journal**, v.7, n.172, 2008.

DUTTA, S.; MALHOTRA, P.; CHAUHAN, V.S. Sequence analysis of apical membrane antigen 1 (AMA1) of *Plasmodium cynomolgi bastianelli*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.73, n.1-2, p.267- 270, 1995.

DUTTA, S. et al. Mode of action of invasion-inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum*. **Infection and Immunity**, v.73, n.4, p.2116- 2122, 2005.

ENGELHARD, V.H. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. **Annual Review of Immunology**, v.12, p.181–207, 1994.

FANG, X.D. et al. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 44, n.1, p.125 - 132, 1991.

FIGTREE, M. et al. Plasmodium vivax synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduce from diversity in AMA-I and MSP-I genes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.108, n.1, p.53- 66, 2000.

FRITSCH, T.R.; SMITH, J.W. Parasitologia médica. In: HENRY, J.B. Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais. Ed.19ª, New York. Editora Manole, 1999, p.1252-1331.

GAFFAR, F.R. et al. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. **Infection and Immunity**, v.72, n.5, p.2947-2955, 2004.

[GALINSKI, M.R.](#) et al. A reticulocyte-binding protein complex of Plasmodium vivax merozoites. **Cell**, v.69, n.7, p. 1213-1226,1992.

GALINSKI, M.R.; BARNWELL, J.W. *Plasmodium vivax*: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. **Parasitology Today**, v.12, n.1, p.20-29, 1996.

GALINSKI, M.R. et al. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled motifs in an alanine-rich central domain. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.101, n.1-2, p.131-147, 1999.

GARNHAM, P.C.C. Comments on biology of human malaria. **Military Medicine**, v.131, n.9, p.1011- 1012, 1996. Supplement.

GELDER, C.M. et al. Associations between human leukocyte antigens and nonresponsiveness to influenza vaccine. **Journal of Infectious Diseases**, v.185, n.1, p.114-117, 2002.

GERMAIN, R.N. Binding domain regulation of MHC class II molecule assembly, trafficking, fate, and function. **Seminars in Immunology**, v.7, n.6, p.361- 372, 1995.

GILBERT, S.C. et al. Association of malaria parasite population structure HLA and immunological antagonism. **Science**, v.279, n.5354, p.1173-1177, 1998.

GREENWOOD, B.M. et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, v.118, n.4, p.1266-1276, 2008.

GRYNBERG, P. et al. Polymorphism at the apical membrane antigen I locus reflects the world population history of *Plasmodium vivax*. **BMC Evolutionary Biology**, v.8, p.123, 2008.

GUNASEKERA, A.M. et al. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, n.4, p.939-947, 2007.

HEHL, A.B. et al. *Toxoplasma gondii* homologue of *Plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. **Infection and Immunity**, v.68, n.12, p.7078-7086, 2000.

HEPPNER, D.G. Jr. et al. Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against *falciparum* malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. **Vaccine**, v.23, n.17-18, p.2243-2250, 2005.

HERRERA, S. et al. Antigenicity and immunogenicity of multiple antigen peptides (MAP) containing *Plasmodium vivax* CS epitopes in *Aotus* monkeys. **Parasite Immunology**, v.19, n.4, p.161-170, 1997.

HERRERA, S. et al. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombia malaria-naive volunteers by *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, p.3-9, 2005.

HERRINGTON, D.A. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant sporozoite malaria vaccine against *Plasmodium vivax*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.45, n.6, p.695-701, 1991.

HILL, A.V. et al. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. **Nature**, v.352, n.6336, p.595-600, 1991.

HOFFMAN, S.L. et al. Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. **Science**, v.237, n.4815, p.639-642, 1987.

HODDER, A.N. et al. The disulphide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.271, n.46, p.29446- 29452, 1996.

HODDER, A.N.; CREWETHER, P.E.; ANDERS, R.F. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. **Infection and Immunity**, v.69, n.5, p.3286- 3294, 2001.

HOWELL, S.A. et al. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.276, n.33, p.31311- 31320, 2001.

HOWELL, S.A. et al. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.278, n.26, p.23890- 23898, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE** – Cidades. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidades>>. Acesso em 19 de dezembro de 2007.

IVER, J.; GRÜNER, A.C.; SNOUNOU, G.; PREISER, P.R. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. **Molecular Microbiology**, v.65, n.2, p.231-249, 2007.

JENKINS, M.K. et al. In vivo activation of antigen- specific CD4 cells. **Annual Review of immunology**, v.19, p.23- 45, 2001.

JOHNSON, A.H. et al. Human leukocyte antigen class II alleles influence levels of antibodies to the *Plasmodium falciparum* asexual-stage apical membrane antigen 1 but not to merozoite surface antigen 2 and merozoite surface protein 1. **Infection and Immunity**, v.72, n.5, p.2762-2771, 2004

JONGWUTIWES, S. et al. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. **Molecular Biology and Evolution**, v.22, n.8, p.1733-1739, 2005.

KAIN, K.C. et al. Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. **Journal of Infectious Diseases**, v.164, n.1, p.208 -210, 1991.

KAIN, K.C. et al. Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.7, p.1863-1866, 1992.

KAIN, K.C. et al. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, n.4, p.478-484, 1993.

KANEKO, O. et al. The *Plasmodium vivax* homolog of the ookinete adhesive micronemal protein, CTRP. **Parasitology International**, v.55, n.3, p.227-231, 2006.

KAYE, P.M. et al. Deficient expression of costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. **European Journal of Immunology**, v.24, n.11, p.2850-2854, 1994.

KEMP, D. J.; COWMAN, A. F.; WALLKER, D. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum*. **Advances in Parasitology**, v. 29, p. 75-149, 1990.

KIM, J. R. et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Kolkata, India. Malaria Journal, v.5, n.71, 2006.

KIMBI, H.K.; NFORMI, D.; NDAMUKONG, K.J. Prevalence of asymptomatic malaria among school children in a urban and rural area in the Mount Cameroon region. The Central African Journal of Medicine, v.51, n.1-2, p.5-10, 2005.

KIMURA, M., et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. Parasitology International, v. 46, p. 91-95, 1997.

KONGKASURIYACHAI, D. et al. Potent immunogenicity of DNA vaccines encoding *Plasmodium vivax* transmission- blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28- evaluation of homologous and heterologous antigen- delivery prime- boost strategy. **Vaccine**, v.22, n.23-24, p.3205-3213, 2004.

KOUSSIS, K. et al. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for blood cell invasion. **The EMBO Journal**, v.28, n.6, p. 725-735, 2009.

LADEIA-ANDRADE, S. et al. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1₁₉ and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.8, p.943-951, 2007.

LIM, K.J. et al. A direct sandwich ELISA to detect antibodies against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 could be a useful diagnostic method to identify *Plasmodium vivax* exposed persons. **Parasitology Research**, v.88, n.9 p.855-860, 2002.

LUDER, C.G. et al. *Toxoplasma gondii* downregulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STA1 alpha. **European Journal of Immunology**, v.31, n.15, p.1475-1484, 2001.

LUYENDYK, J. et al. Antigen- presenting cell function during *Plasmodium yoelli* infection. **Infection and Immunity**, v.70, n.6, p.2941- 2949, 2002.

MACHADO, R.L.D.; PÓVOA, M.M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P.vivax-like*) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. **Transactions of the Royal society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, n.4, p.377-381, 2000.

MACHADO, R.L.D. et al. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, n.3, p.175-177, 2003.

MARSH S.G.E. et al. Nomenclature for factors of the HLA system. **Human Immunology**, v.66, n.11, p.1183-1186, 2006.

MARSHALL, V.M. et al. Structure of the apical membrane antigen 1 (AMA1) of *Plasmodium chabaudi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.37, n.2, p.281-283, 1989.

MARSHALL, V.M.; ZHANG, L.X.; ANDERS, R.F.; COPPEL, R.L. Diversity of the vaccine candidate AMA1 of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.77, n.1, p.109- 113, 1996.

MENARD, R. et al. Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. **Nature**, v.385, n.6614, p.336-340, 1997.

MENDIS, K. et al. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.64, p.97-106, 2001. Supplement 1-2.

METZGER, W.G. et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. **Parasite Immunology**, v.25, n.6, p.307- 312, 2003.

MILLER, L.H. et al. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **The New England Journal of Medicine**, v.295, n.6, p.302-304, 1976.

MILLER, L.H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v.415, n.6872, p.673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Profissional e gestor**: malária: informações técnicas. Disponível em <<http://www.portaldasaude.gov>> . Acesso em 02 de Julho de 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Profissional e gestor**: malária: informações técnicas. Disponível em <<http://www.portaldasaude.gov>> . Acesso em 10 de Dezembro de 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Brasil visto do Espaço**. Disponível em: <<http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br>>. Acesso em: 16 fevereiro 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Profissional e gestor**: malária: informações técnicas. Disponível em <<http://www.portaldasaude.gov>> . Acesso em 04 de Fevereiro de 2009.

MITCHELL, G.H. et al. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host blood cells. **Infection and Immunity**, v.72, n.1, p.154-158, 2004.

MORAIS, C.G. et al. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. **Parasitology Research**, v.95, n.6, p.420-426, 2005.

MORAIS, C.G. et al. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: Persistence and correlation with malaria transmission intensity. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.4, p.582- 587, 2006.

MÚFALO, B.C. et al. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and Infection**, v.10, p. 1266-1273, 2008.

NARDIN, E.H. et al. Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individual living area of hyperendemic malaria. **Science**, v.206, n.4418, p.597-599, 1979.

NARDIN, E.H. et al. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.156, n.1, p.20-30, 1982.

NARDIN, E.H. et al. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccines of defined HLA genotypes. **The Journal of Infectious Diseases**, v.182, n.5, p.1486-1496, 2000.

NARDIN, E.H. et al. A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune response in volunteers of diverse HLA types. **Journal of Immunology**, v.166, n.1, p.481- 489, 2001.

NARUM, D.L.; THOMAS A.W. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1: an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.67, n.1, p.59-68, 1994.

NEBIE, I. et al. Humoral response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West África. **Infection and Immunity**, v.76, n.2, p.759-766, 2008.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. HLA class II antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P.vivax* (VK210, VK247 and *P.vivax-like*) in individuals naturally exposed to malaria. **Acta tropica**, v.92, n.1, p.63-69, 2004.

PANICHAKUL, T. et al. Production of erythropoietic cells in vitro for continuous culture of *Plasmodium vivax*. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.14, p.1551-1557, 2007.

PARK, J.W. et al. Naturally acquired antibody response to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.1, p.14-20, 2001.

PAROLÍN, M.L.; CARNESE, F.R. HLA-DRB1 alleles in four Amerindian populations from Argentina and Paraguay. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.2, p.212-219, 2009.

PATARROYO, M.E. et al. Genetic control of the immune response to a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum*. **Parasite Immunology**, v.13, n.5, p.509-516, 1991.

PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints simple non-isotopic DNA fingerprint with biotinnylated probes. Eletrophoresis, v. 12, n.2-3, p.14-52, 1991.

PETERSON, M.G. et al. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Cellular Biology**, v.9, n.7, p.3151-3154, 1989.

PETERSON, M.G. et al. Apical membrane antigen of *Plasmodium fragile*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.39, n.2, p.279-283, 1990.

PETZL-ERLER, M.L.; BELICH, M.P.; QUEIROZ-TELLES, F. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. **Human Immunology**, v.32, n.4, p.254-260, 1991.

PIRSON, P.J.; PERKINS, M.E. Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Journal of Immunology**, v.134, n.3, p.1946-1951, 1985.

POLLEY, S.D.; CONWAY, D.J. Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. **Genetics**, v.158, n.4, p.1505-1512, 2001.

POLLEY, S.D.; CHOKEJINDACHAI, W.; CONWAY, D.J. Allele frequency based analyses robustly identify sites under balancing selection in a malaria vaccine candidate antigen. **Genetics**, v.165, n.2, p.555-561, 2003.

POLLEY, S.D. et al. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1) and their association with protection from malaria. **Vaccine**, v.23, n.5, p. 718-728, 2004.

POLLEY, S.D. et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.195, n.2, p.279-287, 2007.

QARI, S.H. et al. Polymorphism in the circumsporozoite protein of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.55, n.1-2, p.105-113, 1992.

QARI, S. H. et al. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. **The Lancet**, v.341, n.8848, p.780-783, 1993a.

QARI, S.H. et al. Global occurrence of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. **Journal of Infectious Diseases**, v.168, n.6, p.1485-1489, 1993b.

RAJESH, V. et al. *Plasmodium vivax*: Genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. **Experimental Parasitology**, v.116, n.3, p.252- 256, 2007.

REED, R.C. et al. Multiple antigen constructs (MACs): induction of sterile immunity against sporozoite stage of rodent malaria parasites, *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii*. **Vaccine**, v.15, n.5, p.482-488, 1997.

REMARQUE, E.J. et al. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends in Parasitology**, v.24, n.2, p.74- 83, 2007.

RILEY E.M.; WAGNER, G.E.; OFORI, M.F.; WHEELER, J.G.; AKANMORI, B.D.; TETTEH, K.; McGUINNESS, D.; BENNETT, S.; NKRUMAH, F.K.; ANDERS, R.F.; KORAM, K.A. Lack of association between maternal antibody and protection of African infants from malaria infection. **Infection and Immunity**, v.68, n.10, p.5856-5863, 2000.

ROCK, K.L.; YORK, I.A.; GOLDBERG, A.L. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. **Nature Immunology**, v.5, n.7, p.670-677, 2004.

RODRIGUES, M.H. et al. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malaria Journal**, v.2, n.1, p.39, 2003.

RODRIGUES, M.H. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **International Journal for Parasitology**, v.35, n.2, p.185-192, 2005.

ROGERS, W.O. et al. Protection of rhesus macaque against lethal *Plasmodium knowlesi* malaria by a heterologous DNA priming and poxvirus boosting immunization regimen. **Infection and Immunity**, v.70, n.8, p.4329-4335, 2002.

ROSENBERG, R. et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science**, v.245, n.4921, p.973-976, 1989.

ROSENBERG, E.S. et al. Vigorous HIV-1- specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. **Science**, v.278, n.5342, p.1447- 1450, 1997.

RUDOLFO, H. et al. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.40, n.4, p.535-543, 2007.

RYAN, J.R. et al. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.75, n.4, p.575-581, 2006.

SAINI, D.K. et al. Cloning, overexpression, purification, and matrix-assisted refolding of DevS (Rv3132c) histidine protein kinase of *Mycobacterium tuberculosis*. Protein Expression and Purification, v.25, n.1, p.203-208, 2002.

SAHA, B. et al. Macrophage- T cell interaction in experimental mycobacterial infection. Selective regulation of costimulatory molecules on *Mycobacterium*- infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immune response. European Journal of Immunology, v.24, n.11, p.2618- 2624, 1994.

SALZANO, F.M. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.74, n.2, p.223-263, 2002.

SCHWARZER, E. et al. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD 11c in human monocytes. Infection and Immunity, v.66, n.4, p.1601- 1606, 1998.

SCORZA, T. et al. Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. Parasite Immunology, v.21, n.11, p.545-554, 1999.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) – Malária. Resumo epidemiológico de malária no Brasil. Dados de 01 de janeiro de 2009 a 10 de fevereiro de 2009. Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria>. Acesso em: 12 de Fevereiro de 2009.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) – Malária. Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal. **Dados de 01 de janeiro de 2008 a 31 de dezembro de 2008.** Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria>. Acesso em: **12 de Fevereiro de 2009.**

SILVIE, O.J. et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.279, p.9490-9496, 2004.

SINGH, A.P. et al. Targeted deletion of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein confirms its role in junction formation during invasion. **Molecular Microbiology**, v.55, n.6, p.1925-1934, 2005.

SINGH, S.K. et al. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. **Nature**, v.439, n.7077, 741-744, 2006.

SINNIS, P.; NARDIN, E. Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin related anonymous protein. **Chemical Immunology**, v.80, p.70-96, 2002.

SNOW, R.W. et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, v.434, n.7030, p.214-217, 2005.

SOARES, I.S. et al. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. **Molecular Medicine**, v.5, n.7, p.459- 470, 1999.

STEPHENS, H.A. et al. The presence of the HLA class II allele DPB1*0501 ethnic Thais correlates with an enhanced vaccine- induced antibody response to a malaria sporozoite antigen. **European Journal of Immunology**, v.25, n.11, p.3142- 3147, 1995.

STERN, L.J. et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. **Nature**, v.368, n.6468, p.215- 221, 1994.

STORTI- MELO, L.M. et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.103, n.7, p.672-678, 2009.

TALITHA, P.V. et al. Production of the subdomains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 ectodomain and analysis of the immune response. **Infection and Immunity**, v.72, n.8, p.4464-4470, 2004.

THOMAS, A.W.; WATERS, A.P.; CARR, D. Analysis of variation in Pf83, an erythrocyte merozoite vaccine candidate antigen of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.42, n.2, p.285- 287, 1990.

TODD, J.R.; WEST, B.C.; McDONALD, J.C. Human leukocyte antigen and leprosy: study in northern Louisiana and review. **The Journal of Infectious Diseases**. v.12, n.1, p.63-74, 1990.

TREECK, M. et al. Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the domain in the invasion process. **PloS Pathogens**, v.5, n.3, p.e1000322, 2009.

TRIGLIA, T. et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Molecular Microbiology**, v.38, n.4, p.706-718, 2000.

UDHAYAKUMAR, V. et al. Immunogenicity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein repeat multiple antigen constructs (MAC). **Vaccine**, v.16, n.9-10, p.982-988, 1998.

UDHAYAKUMAR, V. et al. 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.2, p.100-107, 2001.

UDOMSANGPETCH, R. et al. Short-term in vitro culture of field isolates of *Plasmodium vivax* using umbilical cord blood. **Parasitology International**, v.56, n.1, p.65-69, 2006

URBAN, B.C. et al. *Plasmodium falciparum*- infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, v.400, n.6739, p.73- 77, 1999.

VANDERBERG, J.; NUSSENZWEIG, R.; MOST, H. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *In vitro* effects of immune serum on sporozoites. **Military Medicine**, v.134, n.10, p.1183-1190, 1969.

VAN OVERTVELT, L. et al. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: Inhibition of cytokines, HLA- DR, and costimulatory molecules. **Infection and Immunity**, v.67, n.8, p.4033- 4040, 1999.

VARGAS-SERRATO, E. et al. Merozoite surface protein-9 of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites is orthologous to p101/ABRA of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.120, n.1, p.41-52, 2002.

WATERS, A.P. et al. A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.265, n.29, p.17974- 17979, 1990.

WATERS, A.P. et al. Intra-generic conservation and limited inter-strain variation in a protective minor surface antigen of *Plasmodium knowlesi* merozoites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.44, n.1, p.141- 144, 1991.

WATTS, C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. **Nature Immunology**, v.5, p.685–690, 2004.

WICKRAMARACHCHI, T. et al. Natural Human Antibody Response to *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 under Low Transmission and Unstable Malaria conditions in Sri Lanka. **Infection and Immunity**, v. 74, n.1, p. 789-801, 2006.

WICKRAMARACHCHI, T. et al. Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface

Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.2, p.199-208, 2007.

WIRTZ, R.A. et al. Prevalence of antibody to heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Thailand, **Lancet**. v.336, n.8715, p.593-595, 1990.

WONGSRICHANALAI, C. et al. Naturally acquired circumsporozoite antibodies and their role in protection in endemic falciparum and vivax malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.44, n.2, p.201-204, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – **WHO** – Health topics: malaria. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 09 de Junho de 2007.

WU, Y. et al. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. **PLoS ONE**, v.3, n.7, p.e2636, 2008.

YADAVA, A. et al. A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. **Infection and Immunity**, v.75, n.3, p.1177-1185, 2007.

YUDA, M. et al. von Willebrand Factor A domain- related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout *Plasmodium* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.116, n.1, p.65-72, 2001.

ZAGO, M.A. O apoio da genética à história dos brasileiros. **Pesquisa FAPESP**, v.28, p.32-35, 2000.

ZHU, Y. et al. Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide- binding motif. **Journal of Molecular Biology** v.326, n.4, p.1157- 1174, 2003.

ANEXO



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8882 de 27/09/04
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.170 de 14/06/74)

Parecer n.º 235/2006

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 3784/2006 sob a responsabilidade de Luciane Moreno Storti de Melo com o título "Genótipos da Proteína Circunsporozoítica de *Plasmodium vivax* associados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade", está de acordo com a Resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 10 de Julho de 2006.

Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP