



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

Estudos sobre o envolvimento de *clag9* (*cytoadherence linked asexual gene*) durante a remodelação do eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* e sua participação no desenvolvimento da imunidade em malária

**JOANA D'ARC NEVES COSTA**

**Porto Velho – Rondônia**

**2012**



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

**JOANA D'ARC NEVES COSTA**

Estudos sobre o envolvimento de *clag9* (*cytoadherence linked asexual gene*) durante a remodelação do eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* e sua participação no desenvolvimento da imunidade em malária.

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia – UNIR como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental.*

**Área de Concentração:** Parasitologia

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva

**Porto Velho – Rondônia**

**2012**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

C837e

Costa, Joana D'Arc Neves

Estudos sobre o envolvimento de *clag9* (*cytoadherence linked asexual gene*) durante a remodelação do eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* e sua participação no desenvolvimento da imunidade em malária/ Costa, Joana D'Arc Neves Costa. Porto Velho, Rondônia, 2012.

158f

Tese (Doutorado em Biologia Experimental) Fundação Universidade Federal de Rondônia/UNIR.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva

1. Plasmodium. 2. Clag9. 3. Citoaderência. 4. Malária. 5. PvCLAG7 I. Silva, Luiz Hildebrando Pereira da II. Título.

CDU: 616.936

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA**

Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental (*PGBioExp*)

---

**Candidato (a):** JOANA D'ARC NEVES COSTA

**Titulo da Tese:** Estudos sobre o envolvimento de *clag9* (*cytoadherence linked asexual gene*) durante a remodelação do eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* e sua participação no desenvolvimento da imunidade em malária.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva

A Comissão julgadora do trabalho de defesa da tese de doutorado, em sessão publica, realizada a // , considerou-o

( ) Aprovado

( ) Reprovado

**Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva** – Orientador (presidente da Banca)

Instituição: *UNIR/PGBIOEXP* Assinatura \_\_\_\_\_

**Dr Rodrigo Stábili Guerino**

Instituição: *UNIR/PGBIOEXP* Assinatura \_\_\_\_\_

**Dr Ricardo Tostes Gazinelli**

Instituição: *FIOCRUZ/MG* Assinatura \_\_\_\_\_

**Dr Gerhard Wunderlich**

Instituição: *USP* Assinatura \_\_\_\_\_

**Dr Juan Miguel Villalobos Salcedo**

Instituição: *UNIR/PGBIOEXP* Assinatura \_\_\_\_\_

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério”.*

*“É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda a ciência e arte.”*

*Albert Einstein*

*Ao "professor" Dr Luiz Hildebrando Pereira da Silva meu orientador, pela sua dedicação e empenho, que foram essenciais para este estudo, por ter colaborado direta e continuamente para o meu aprendizado, por me proporcionar a oportunidade de aprender e ter "courage".*

*Ao meu amado pai **Wilson** fonte de inspiração, pelos ensinamentos de amor incondicional, de vida e pelas duras palavras, as quais me tornaram mais madura. Seu carinho, honestidade e humildade me ensinaram a ser uma pessoa melhor, apesar das agruras constantes, podemos tornar os pequenos momentos repletos de alegrias e luz “in memorium”.*

*À minha amada mãe **Ezadir**, que mesmo à distância, acreditou na educação ensinada, me deu carinho, afeto nos momentos difíceis, sempre rezou por mim pedindo proteção...*

*A todos da família, minha admiração e meu muito obrigado por me guiarem nos árduos caminhos do crescimento, sempre cheios de carinho, alegria e amor. Por todo o incentivo durante todas as etapas. Aos queridos e eternos elos, fraternos agradecimentos por toda a paciência, amor, carinho e incentivo inesgotável.*

## AGRADECIMENTOS

Em especial, gostaria de agradecer...

Aos pacientes, que participaram e se entregaram ao desconhecido em busca da luz da pesquisa.

Ao Dr **Paulo Eduardo Martins Ribolla** por me receber em seu laboratório e incentivar no estudo.

Aos Mestres e doutores por todos os ensinamentos.

Ao Dr **Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro** e a Dr<sup>a</sup> **Maria de Fátima Ferreira da Cruz** pela oportunidade em participar do Seminário Laveran & Deane 2007.

Ao Dr **Gerhard Wunderlich** por me ajudar resolver os dilemas nos momentos cruciais e por fornecer gentilmente as proteínas recombinantes.

Ao Dr **Rodrigo Guerino Stábeli** e sua equipe pela ajuda e colaboração durante o desenvolvimento do estudo.

Aos membros da banca de qualificação: Dr **Ricardo de Godoi Mattos Ferreira**, Dr **Tony Hiroshi Katsuragawa**, Dr **Mauro Shugiro Tada**, Dr<sup>a</sup> **Juliana P. Zuliani**.

A todos os amigos e colegas da Pós-Graduação: **Josileide, Cezarino, Fernando Zanchi, Maisa, Fernanda, Eduardo, Deusilene, Soraia, Leandro**, as alunas de iniciação científica: **Pollyanna das Neves Aguiar, Synthia de Souza Silva** pelos ensinamentos durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que compõe o **CEPEM/SESAU, IPEPATRO, UNIR, FHEMERON, EMBRAPA, LACEN e FIOCRUZ**.

Aos amigos do laboratório de Epidemiologia Molecular de Malária em especial ao **Francisco Lurdevanhe da Silva Rodrigues** e ao **Roger Lafontaine Mesquita Taborda**. Pelo apoio dado.

Ao Prof Dr **Mariano Zalis** por ter cedido à cepa do parasito e ao Dr **Arthur Scherf** por ter cedido à linhagens celulares CHO.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, por atender ao pedido de bolsa para estudos no exterior.



À Deus por iluminar meus caminhos e por dar força, paz e serenidade ao longo desta jornada.

A todos que de algum modo me incentivaram, contribuíram e participaram de alguma forma deste trabalho, pela colaboração valorosa em todos os momentos.

*“Enfim, agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém e reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom da auto-suficiência. Ninguém e nada crescem em seu “jardim”, sempre é preciso um olhar, uma palavra, uma ajuda, um gesto de compreensão, paciência, incentivo e uma atitude de humildade”.*

*Muito obrigado!*

Este trabalho foi desenvolvido segundo os aspectos éticos de pesquisa envolvendo seres humanos e animais e foi aprovado em 13/12/2007 (Anexo III) e foi realizado no laboratório de Epidemiologia Molecular de Malária do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – **CEPEM** e no Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais – **IPEPATRO** e contou com apoio do Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento (**CNPQ**) e Financiadora de Estudos e Projetos (**FINEP**).

## RESUMO

Costa, J.D.N. **Estudos sobre o envolvimento de *clag9* (*cytoadherence-linked assexual gene*) durante a remodelação do eritrócito infectado com *P. falciparum* e sua participação no desenvolvimento da imunidade em malária.** 2012. 158f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO.

No presente estudo foi avaliado possível papel indireto do PfCLAG9 na citoaderência e a participação como alvo imunológico. Foram analisadas amostras de parasitos de *P. falciparum* isolados de pacientes da região de Porto Velho, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira, os quais foram submetidos a ciclos sucessivos de *panning* para os receptores endoteliais. O experimento consistiu de sequenciar, comparar a expressão relativa do gene *Pfclag 9* utilizando o método da PCR em tempo real e ensaios de imunodeteção. Foram desenhados peptídeos sintéticos de diferentes regiões da proteína CLAG9, avaliadas a antigenicidade em soros dos pacientes sintomáticos e assintomáticos com *Plasmodium sp.* Os isolados de pacientes com *P. falciparum*, P3, P5 e P59 e suas linhagens selecionadas com especificidade para os receptores CHO<sub>CSA-K1</sub>, CHO<sub>CD36</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub>, não demonstraram uma variação na expressão do gene *Pfclag9* quando comparados com os genes normalizadores. A região sequenciada demonstrou similaridade de 100%, quando comparadas com a cepa de referência 3D7. Na análise sorológica realizada com os peptídeos sintéticos foi observada uma maior reatividade em soros de portadores assintomáticos e confirmados os estudos realizados Papua-Nova Guiné e na Colômbia. Surpreendentemente, os portadores assintomáticos com parasitos de *P. vivax*, também demonstraram um elevado grau de reatividade cruzada contra os mesmos peptídeos de *P. falciparum*. A análise nos bancos de antígenos por bioinformática demonstrou um elevado grau de similaridade entre as sequências de PfCLAG9 e PvCLAG7 (84%). Paralelamente, os anti-soros policlonais de BALB/c interagiram com os parasitos de *vivax* e *falciparum*. O resultado reforça a proposta de PvCLAG7 como ortólogo de PfCLAG9 e pode sugerir o mesmo papel funcional para ambas as proteínas. Isso suscita a hipótese de que eles podem estar envolvidos na regulação da densidade populacional durante a infecção mista exercida pela resposta imune do hospedeiro, além de provavelmente desempenhar funções importantes em ambas às espécies do parasito.

**Palavras-Chaves:** *Plasmodium*, Clag9, Citoaderência, Malária, PvCLAG7.

## ABSTRACT

Costa, J.D.N. **Studies regarding the involvement of *clag9* (cytoadherence-linked asexual gene) during the remodeling of the *P. falciparum* infected erythrocyte and its participation in the development of immunity to malaria.** 2012. 158f. PhD. Thesis (Doutoral) – Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO.

In the present study we indirectly evaluated the possible role of PfCLAG9 in cytoadherence (cytoadherence-linked asexual gene) and its role in the development of immunity. We analyzed samples of *P. falciparum* isolates from patients in the endemic area of Porto Velho, Rondônia, Western Brazilian Amazon. Each sample was subjected to successive rounds of panning for endothelial receptors. The study consisted of gene sequencing, comparison of the relative expression of the gene *Pfclag9* using real-time PCR methodology and immunodetection assays. The synthetic peptides were designed based on different regions of the protein CLAG9, and their antigenicity was evaluated using sera from symptomatic and asymptomatic patients infected with *Plasmodium* sp. The P3, P5, P59 *P. falciparum* isolates and their CHO-K1 CSA, CHO CD36, and CHO ICAM-1 adhesive strains were subjected to gene expression analysis. The wild type and selected strains did not show variation in gene expression when compared with housekeeping genes. The sequenced regions showed 100% similarity when compared to the reference strain 3D7. In serological analysis performed with synthetic peptides we observed higher reactivity with sera from asymptomatic carriers, confirming previous studies from Papua New Guinea and Colombia. Surprisingly, asymptomatic patients infected with *P. vivax* also showed a high degree of cross-reactivity against these *P. falciparum* peptides. The analysis of antigens by bioinformatics demonstrated a high degree (84%) of similarity between the sequences PfCLAG9 and PvCLAG7. In parallel, mice polyclonal antisera were tested and these reacted both with *P. vivax* and *P. falciparum* parasites. The results reinforce the idea that PvCLAG7 is a ortholog of PfCLAG9 and may exert the same function in both parasites. Furthermore, the cross-recognition may point to an antigen which-when recognized by the host's immune system is important in the regulation of parasites densities in infected individuals.

**Key-words:** *Plasmodium*; Clag9; cytoadherence; Malaria; PvCLAG7.

## LISTA SIGLAS E ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante completo de Freud
AIF	Adjuvante incompleto de Freud
Abs	Absorbância lida em espectrofotômetro
ABI	<i>Applied Biosystems</i>
AM	Amazonas
CD	<i>Cluster differentiation</i>
°C	Graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEPEM	Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
CHO	Célula Ovariana de Hamster
<i>Clag</i>	<i>cytoadherence-linked asexual gene</i>
CIDR	<i>Cysteine-rich interdomain region</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CSA	Chondroitin sulfato A
Ct	ciclo limiar ou <i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	deoxynucleotide Triphosphates – (dATP,dTTP,dCTP,dGTP)
D.O.	Densidade Óptica
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	Separação de células ativadas por fluorescência
FCS	Soro fetal bovino ( <i>fetal calf serum</i> )
g	Aceleração da gravidade ( $9,8\text{m/s}^2$ )
gDNA	DNA genômico
GST	glutathione-S-adenosiltransferase
H	Hora(s)
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
ICAM 1	Molécula de Adesão Intercelular- 1
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
IPEPATRO	Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais
IR	Índice de reatividade
Kb	Kilobases
M	Molar
mM	Milimolar ( $10^{-3}$ molar)
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
N <sub>2</sub>	Nitrogênio gasoso
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio (razão de chances)

pb	Pares de Base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
pg	Picograma
pH	Concentração hidrogeniônica
RNA	Ácido ribonucléico
RO	Rondônia
RPM	rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida por reação em Cadeia da Polimerase
RTqPCR	Transcrição Reversa seguido da Reação quantitativa da Polimerase em Cadeia
SFB	Soro Fetal Bovino
SIVEP	Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica Malária
TA	Temperatura ambiente
TAE	Base tris, ácido acético e EDTA (solução tampão)
TBE	Base tris, ácido bórico e EDTA (solução tampão)
TM	Transmembrana
U	Unidades
UV	Luz ultravioleta
V	Volts
VCAM	Molécula de Adesão da Célula Vascular

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1. Generalidades sobre o ciclo esquizogônico de <i>Plasmodium sp.</i> .....	24
1.2. Etapas durante a invasão dos eritrócitos pelo <i>Plasmodium</i> .....	25
1.3. Elementos estruturais da anatomia funcional no ciclo esquizogônico assexuado de <i>P. falciparum</i> .....	28
a) Róptrias:.....	28
b) Micronemas:.....	28
c) Grânulos densos:.....	28
1.4. Estrutura <i>Maurer`s clefts</i> .....	31
1.5. Principais proteínas dos merozoitos .....	32
1.5.1. Proteínas das Róptrias.....	34
1.5.2. As Proteínas RAP-1, RAP-2, RAP-3.....	34
1.5.3. <i>Neck Rhoptry Protein</i> (RON 2-5).....	34
1.5.4. Proteínas do complexo RhopH.....	34
1.6. Anatomia funcional do eritrócito parasitado <i>P. falciparum</i> .....	36



1.6.1. Citoaderência.....	37
1.7. Genes <i>var</i> e seus produtos PfEMP-1.....	37
1.8. Família <i>Clag</i> ( <i>Cytoadherence linked asexual gene</i> ).....	39
1.8.1. CLAG3.1 e CLAG3.2.....	43
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
2.1. Objetivo Geral.....	45
2.2. Objetivos Específicos.....	45
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
3.1. Área e população do estudo.....	47
3.2. Amostras biológicas de pacientes.....	48
3.2.1. Locais de Coleta.....	48
a) - Comunidades Ribeirinhas.....	48
b) - Comunidade Santo Antônio.....	48
c) - A Vila Candelária (Candelária).....	49
d) - Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPEM.....	49
3.2.2. Extração de DNA e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	49
3.3. Ensaio <i>in vitro</i> .....	50
3.3.1. Isolados de <i>P. falciparum</i> e linhagens de células ( <i>Chinese Hamster ovary</i> ).....	50
3.3.2. Isolamento das amostras dos pacientes com <i>P. falciparum</i> .....	50
3.4. Criopreservação dos parasitos.....	51
3.5. Sincronização da cultura.....	52

3.6. Enriquecimento dos trofozoítos.....	52
3.7. Cultivo de Células <i>Chinese Hamster Ovary</i> .....	52
3.8. Citoaderência de linhagens dos isolados naturais de <i>P. falciparum</i> .....	53
3.9. Extração de DNA e purificação dos produtos da PCR.....	54
3.10. Clonagem de fragmentos do gene <i>clag9</i> .....	55
3.11. Extração de DNA plasmidial e sequenciamento.....	56
3.12. Controle de <i>Mycoplasma sp</i> .....	57
3.13. Desenho dos iniciadores .....	57
3.14. Extração de RNA.....	59
3.15. Tratamento com DNase e síntese do cDNA.....	60
3.16. Transcrição Reversa seguido da Reação quantitativo da Polimerase em Cadeia (RTqPCR).....	61
3.17. Método $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	64
3.18. Metodologias dos estudos imunológicos.....	66
3.18.1. Peptídeos PfCLAG9.....	66
3.18.2. Ensaio Imunoenzimático - ( <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> ) ELISA	67
3.19. ELISA anti-PfMSP1-19 e anti-PvMSP1-19 (Proteínas de Superfície de Merozoítos de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> ).....	68
3.20. Determinação do limiar e do Índice de Reatividade (IR).....	68
3.21. Imunização dos camundongos com peptídeos sintéticos de PfCLAG9.....	69
3.22. Imunofluorescência Indireta (IFI).....	70
3.23. Análise dos dados.....	70

3.24. Consentimento ético.....	71
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
4.1. Caracterização das amostras biológicas dos pacientes e localidades.....	73
4.2. Avaliação da possível participação indireta do produto do gene <i>Pfclag9</i> na citoaderência dos eritrócitos parasitados.....	74
4.3. Preparação das linhagens dos isolados naturais de <i>P. falciparum</i> com especificidade de citoaderência. ....	76
4.4. Análises das sequências do gene <i>Pfclag9</i> em diferentes isolados diretamente de pacientes e linhagens selecionadas desses. ....	78
4.4.1. Análises das sequências do gene <i>Pfclag9</i> de isolados naturais P54, P57, P65 e das cepas de referência controle Dd2 e 3D7.....	79
4.5. Análise da transcrição de gene <i>Pfclag9</i> por RTqPCR .....	79
4.5.1. Comparação da expressão relativa do gene <i>Pfclag9</i> em linhagens dos isolados em relação à cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> .....	85
4.5.2. Quantificação relativa (RQ) da expressão do gene <i>Pfclag9</i> nos isolados dos pacientes P3, P5, P59 de <i>P. falciparum</i> relativo aos genes de referência <i>Seryl-tRNA Sintetase</i> (SER), Actina (ACT) e <i>Frutose biphosphatase aldolase</i> (FRUT). ....	87
4.6. Análise de funções dos produtos do gene <i>Pfclag9</i> no desenvolvimento de respostas imunes.....	91
4.6.1. Estrutura dos peptídeos sintéticos representando ou contendo epitopes B potenciais do gene <i>Pfclag9</i> .....	91
4.6.2. Avaliação de anti-PfCLAG9 no soro de pacientes sintomáticos e portadores assintomáticos de parasitos da malária.....	92
4.7. Especificidade da resposta humoral contra CLAG9.....	94
4.8. Bases moleculares da reação cruzada de anticorpos contra PfCLAG9.....	99
4.9. Reatividade cruzada de anticorpos murinos induzidos por peptídeos sintéticos de PfCLAG9 .....	99
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>108</b>

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
8. ANEXOS: .....	<b>126</b>
ANEXO I: Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE).....	127
ANEXO II: Formulário Individual do paciente.....	128
ANEXO III: Parecer Ministerio da Saúde 964/2007/CONEP.....	130
ANEXO IV: Parecer CEP/070/2008 CEPEM.....	134
ANEXO V: Parecer CEUA 12/04/2010 – IPEPATRO.....	136
ANEXO VI: Avaliação das sequências dos três clones do isolado paciente P59.....	138
ANEXO VII: Análise das sequências em aminoácidos da região dos exon 9 do gene <i>Pfclag9</i> dos isolados dos pacientes P59,P1,P2, P3, P5, P54, P57, P65 e cepas 3D7, Dd2 e W2. ....	140
ANEXO VIII: Manuscrito.....	142
ANEXO IX: Formulario Clinico.....	151

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	A infecção dos eritrócitos e o ciclo assexuado sanguíneo do <i>P. falciparum</i> .	25
<b>Figura 2:</b>	Modelo esquemático das etapas durante a invasão dos merozoítos de <i>P. falciparum</i> , em eritrócitos.	26
<b>Figura 3:</b>	Desenvolvimento do <i>P. falciparum</i> em eritrócitos.	31
<b>Figura 4:</b>	(A) Esquema tridimensional do merozoíto e organelas. (B) Merozoíto de <i>P. falciparum</i> em processo de invasão.	32
<b>Figura 5:</b>	Citoaderência do eritrócito parasitado.	36
<b>Figura 6:</b>	Esquema da Estrutura da PfEMP1	39
<b>Figura 7:</b>	Esquema do telômere do cromossomo 9	42
<b>Figura 8:</b>	Esquema de modelagem funcional proposta do <i>Plasmodial Surface Anion Channel</i> (PSAC).	43
<b>Figura 9:</b>	Mapa do município de Porto Velho – Rondônia	47
<b>Figura 10:</b>	Transcrição reversa seguida da Reação quantitativa da Polimerase em Cadeia (RTqPCR).	63
<b>Figura 11:</b>	Quantificação do gene <i>Pfclag9</i> em Dd2 relativo 3D7, número de cópias estimado utilizando o método delta, delta Ct, $2^{-\Delta\Delta CT}$ .	65
<b>Figura 12:</b>	(A) Células CHO <sub>ICAM-1</sub> antes e (B) após <i>panning</i> P59 CHO <sub>ICAM-1</sub> , (C) CHOK1 <sub>CSA</sub> , (D) P59 CHO <sub>CD36</sub> .	76
<b>Figura 13:</b>	Alinhamento das sequências dos aminoácidos obtidas do exon 9 do gene <i>Pfclag9</i> .	78
<b>Figura 14:</b>	Alinhamento das sequências em aminoácidos obtidas do último exon do gene <i>Pfclag9</i> .	79
<b>Figura 15:</b>	Avaliação da qualidade dos RNAs em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.	80
<b>Figura 16:</b>	(A) RT-PCR da região do último exon do gene <i>Pfclag9</i> de <i>P. falciparum</i> dos isolados dos pacientes P59, P5 e P3.	81
<b>Figura 17:</b>	(A) e (B) Curva padrão para determinação da eficiência dos iniciadores gerada pelo <i>Software 7500 SDS</i> .	82
<b>Figura 18:</b>	Quantificação relativa do gene <i>Pfclag9</i> cepa 3D7	87
<b>Figura 19:</b>	(A), (B) e (C) Quantificação relativa do gene <i>Pfclag9</i> do isolado P3, P5 e P59.	89

<b>Figura 20:</b>	(A) Mapeamento da região do cromossomo 9. (B) Confirmação do tamanho dos fragmentos	90
<b>Figura 21:</b>	Peptídeo A correspondendo a uma região de 32 aa. entre os resíduos 728 – 760 peptídeos B região com 43 aa. entre os resíduos 901 - 944, peptídeo C região com 56 aa. entre os resíduos 1284 – 1340 da proteína CLAG9.	91
<b>Figura 22:</b>	Frequência e níveis de anticorpos contra PfCLAG9 e contra proteínas recombinante de MSP1-19 em pacientes sintomáticos e assintomáticos de <i>P. falciparum</i> .	93
<b>Figura 23:</b>	Similaridade entre as sequências dos peptídeos sintéticos A, B e C das regiões da proteína PfCLAG9	95
<b>Figura 24:</b>	Análise dos anticorpos contra os peptídeos sintéticos A, B e C correspondentes a diferentes regiões da proteína PfCLAG9 e contra proteínas recombinante de MSP1-19 em pacientes sintomáticos (Sint.) e assintomáticos (Assint.) de <i>P. vivax</i> .	96
<b>Figura 25:</b>	Análise dos anticorpos contra os peptídeos sintéticos A, B e C correspondentes a diferentes regiões da proteína PfCLAG9 e contra proteínas recombinante de MSP1-19 em pacientes sintomáticos (Sint.) e assintomáticos (Assint.) de <i>P. falciparum</i> .	99
<b>Figura 26:</b>	Imunofluorescência indireta	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Localização das principais proteínas antes/durante invasão	29
<b>Tabela 2:</b>	Proteínas Neck Rhoptry	35
<b>Tabela 3:</b>	Alguns estudos com moléculas de adesão envolvidas na citoaderência	37
<b>Tabela 4:</b>	Iniciadores da região do gene <i>Pfclag9</i> , do <i>Plasmodium</i> e do <i>Micoplasma sp.</i>	50
<b>Tabela 5:</b>	Perfil das linhagens de células transfectadas	53
<b>Tabela 6</b>	Iniciadores testados nos ensaios de (RTqPCR) do gene <i>Pfclag9</i> .	59
<b>Tabela 7:</b>	Distribuição das amostras biológicas.	73
<b>Tabela 8:</b>	Isolados naturais de <i>P. falciparum</i> .	74
<b>Tabela 9:</b>	Teste de citoaderência dos isolados de <i>P. falciparum</i> .	75
<b>Tabela 10:</b>	Ensaio de citoaderência.	77
<b>Tabela 11:</b>	Valores de inclinação da curva ( <i>Slope</i> ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e eficiência de cada iniciador selecionado para o estudo do gene <i>Pfclag9</i> .	84
<b>Tabela 12:</b>	Valores de inclinação da curva ( <i>slope</i> ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e eficiência da cada oligonucleotídeo selecionado para o estudo como gene constitutivo.	85
<b>Tabela 13:</b>	Quantificação relativa do gene <i>Pfclag9</i> .	86
<b>Tabela 14:</b>	Reatividade dos soros nos ensaios de ELISA.	97
<b>Tabela 15:</b>	Reatividade dos soros de pacientes de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> sintomáticos e assintomáticos.	98

## **1. INTRODUÇÃO**



### 1.1. Generalidades sobre o ciclo esquizogônico de *Plasmodium* sp.

O ciclo de multiplicação assexuada esquizogônico dos parasitos<sup>1</sup> da malária em sua fase eritrocítica de mamíferos hospedeiros, que se sucede ao ciclo hepático, é responsável na malária humana por toda a fisiopatologia e manifestações clínicas durante a infecção. Assim sendo, parece-nos procedente ressaltar que tenha sido objeto de grande interesse por parte de muitos pesquisadores, bem como de um número considerável de estudos, os quais foram concentrados em múltiplos aspectos e temáticas desde sua descrição nas décadas iniciais do século XX.

Ratificamos que o merozoíto possui um repertório de organelas convencionais de células eucarióticas, com a arquitetura geral de citoesqueleto de uma célula apicomplexo, do filo aos quais parasitos da malária pertencem. Isto inclui micronemas na região apical e complexos de organelas secretoras (róptrias e grânulos densos), mitocôndrias, núcleo e retículo (Apicoplasto). Por conseguinte, a membrana plasmática possui uma rede de vesículas membranosas achatadas denominadas de complexo de membrana interna (BANNISTER et al., 2000, 2001).

Os merozoítos liberados do fígado caem na corrente circulatória onde invadem eritrócitos. O contato inicial é crucial passando pelo reconhecimento da célula hospedeira para a invasão pelo parasito. Inicialmente, esse reconhecimento é de baixa afinidade e reversível e ocorre em qualquer ponto da sua superfície. Após, inicia-se a reorientação do merozoíto, no intuito de justapor sua porção apical à membrana eritrocítica e, assim, permitir uma interação.

Durante o ciclo intraeritrocítico (figura 1), o parasito sintetiza e secreta grande quantidade de proteínas e outras moléculas, seja para o citoplasma, seja para participar da neo-modelagem do eritrócito infectado. (BANNISTER et al., 2004; de KONING-WARD et al., 2009; COWMAN et al., 2012).

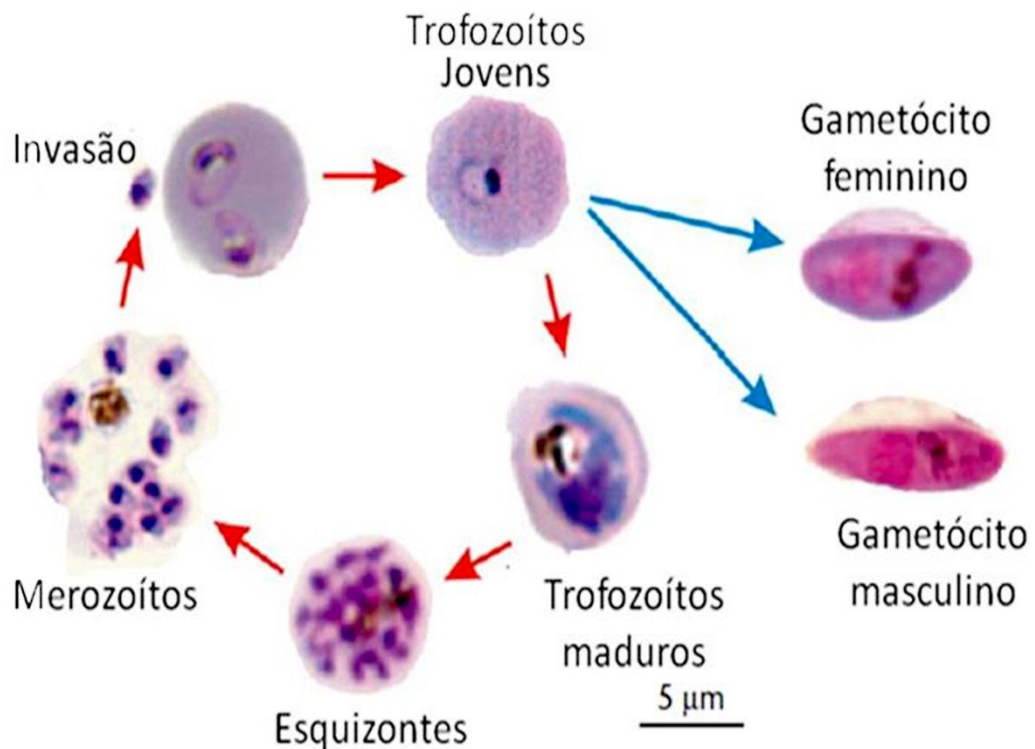
Ressalte-se que o eritrócito infectado não é uma associação passiva entre o eritrócito original estabilizado e o parasito que evolui independentemente. Ocorre uma remodelagem do eritrócito com a elaboração de novas estruturas associadas às estruturas anteriores do eritrócito ou neomodeladas em benefício agora do desenvolvimento, a multiplicação,

---

<sup>1</sup>Os parasitos: conforme Bases de Parasitologia Médica - Rey, 4<sup>a</sup> edição, Ano 2011.

diferenciação e maturação do parasito que, ao fim do ciclo, é liberado novamente em seu estágio merozoíto, mas multiplicado 8 a 32 vezes.

Após algumas gerações de desenvolvimento de merozoítos sanguíneos, alguns parasitos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos que ao serem ingeridos por mosquitos do gênero *Anopheles* (hospedeiro invertebrado), darão continuidade ao ciclo do parasito.



**Figura 1:** A infecção dos eritrócitos e o ciclo asexual sanguíneo do *P. falciparum*, (BANNISTER & SHERMAN, 2009, adaptado).

## 1.2. Etapas durante a invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium* pelos parasitos da malária.

Primeiramente, o reconhecimento e a invasão do eritrócito pelos merozoítos, originários da esquizogonia hepática ou de uma precedente esquizogonia eritrocítica e, em seguida, todas as etapas do desenvolvimento, multiplicação assexuada e maturação da forma intracelular do parasito (figura 2).

Na sequência os merozoítos invadem os eritrócitos, pelos quais possuem atração, por meio de um mecanismo que consiste em numerosos fenômenos complexos, os quais envolvem as organelas e interações. Os fenômenos incluem as seguintes etapas:

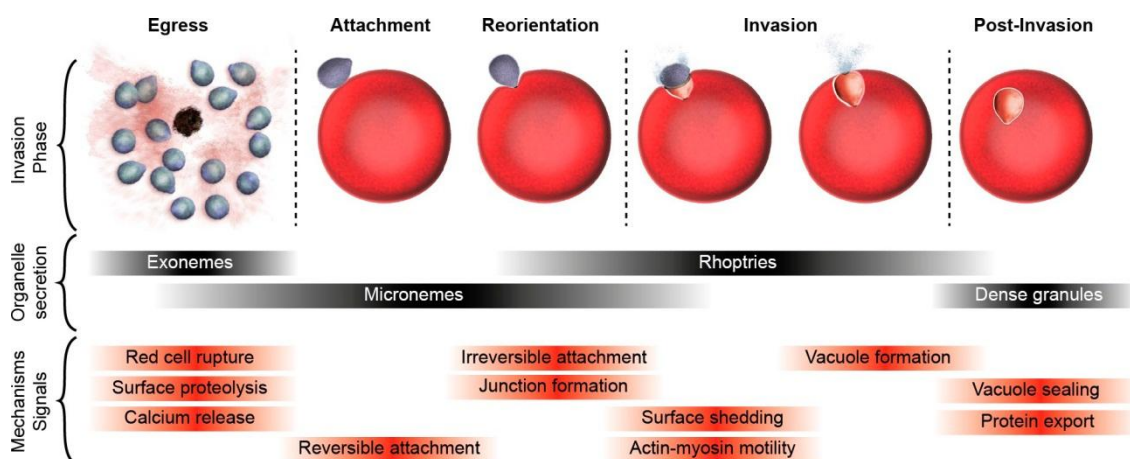
(I) reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à membrana do eritrócito;

(II) reorientação apical do merozoíto em direção à membrana da célula hospedeira, para que os seus ligantes possam interagir;

(III) formação de uma junção irreversível no ponto de contato entre a região apical do parasito e a membrana celular do eritrócito;

(IV) movimento de junção ao redor do merozoíto com simultânea invaginação da membrana do eritrócito, até que o parasito se encontre dentro da célula hospedeira e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo onde inicia-se um desenvolvimento em seu interior e a internalização do parasito. Observa-se, assim, a necessária expressão de funções do parasito. (COWMAN et al., 2012; COWMAN & CRABB, 2006).

As sucessivas observações realizadas pelos pesquisadores interessados no ciclo assexuado eritrocítico indicam que os fenômenos acima resumidos ocorrem nos cinco parasitos humanos *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* conhecidos e nos plasmódios de primatas (COX-SINGH et al., 2010, 2008).



**Figura 2:** Modelo esquemático das etapas durante a invasão dos merozoítos de *P. falciparum*, em eritrócitos (COWMAN et al., 2012).

Durante as fases descritas há necessidade de superação de diversas etapas para a invasão dos merozoítos e se iniciam antes do rompimento da célula hospedeira (hepatócitos ou eritrócitos), acarretando um processo de "priming" envolvendo proteínas para um novo ciclo. Uma protease essencial *Subtilisin-like*, denominada PfSUB1, é liberada nas organelas apicais denominadas *exonemes*, no espaço do vacúolo parasitóforo. A PfSUB1 é responsável pela proteólise das proteínas SERA entre outras proteínas envolvidas (COWMAN et al., 2012).

Uma vez que o merozoíto é liberado do eritrócito infectado, é exposto a níveis baixos de potássio, desencadeando a liberação de cálcio que ativa a secreção de adesinas e invasinas dos micronemas sobre a superfície do parasito (SRINIVASAN et al., 2011).

Quando as proteases dos merozoítos ativados encontram um eritrócito de baixa afinidade, as interações ocorrem com a membrana do eritrócito, hipoteticamente regulada por classes de proteínas de superfície do merozoíto (HODDER et al., 2012). Entre os prováveis candidatos estão MSP DBL1 e -2 e a família de proteínas 6-Cys (SAKAMOTO et al., 2012).

Porém, ainda não se comprovou, se estes processos são parasitos específicos ou se as mudanças de sinais dos merozoítos e o citoesqueleto dos eritrócitos são facilitadores de uma resposta para a interação. As análises de diferentes estudos realizados permitiram verificar que as organelas da maquinaria possuem homologia estrutural na maioria dos membros do filo Apicomplexa, sugerindo que eles partilham biologia funcional semelhante (ZUCCALA & BAUM, 2011).

A natureza biológica e o papel de sinais intra e extracelulares, e os eventos moleculares na modulação do ciclo de vida e de invasão do *Plasmodium* são ainda pouco compreendidos, entretanto, é amplamente aceito que essas etapas, como nas células eucarióticas em geral, são controlados por vias de sinalização celular. É, portanto, razoável a ideia de que cascatas de sinalização celular sejam importantes para o desenvolvimento do parasito (SRINIVASAN et al., 2011).

Com os conhecimentos adquiridos sobre o ciclo eritrocítico assexuado foram desenvolvidos em estudos com o cultivo de *P. falciparum* (TRAGER & JENSEN, 1976), em eritrócitos humanos os quais permitiram avançar na identificação de sinais moleculares de interação entre o parasito (merozoíto) e o eritrócito.

Acumulando uma quantidade e variedade de material para garantir os estudos genômicos que possibilitaram a publicação da sequência completa do genoma da linhagem 3D7 de *P. falciparum*; cujo resultado foram obtidos a partir de um esforço internacional, lançado em 1996 e finalizada em 2002 (GARDNER et al., 2002).

A análise destes procedimentos, e, o posterior conhecimento adquirido possibilitou a descrição das bases moleculares de diversidade antigênica de isolados de parasitos, a identificação de genes e seus produtos relacionados com neomodelagem do eritrócito infectado, a fisiopatologia da infecção, a variação antigênica, o estudo da resistência às

drogas, a virulência da infecção e outros aspectos da relação parasito hospedeiro (RIGLAR et al., 2011; BAUM et al., 2006).

### **1.3. Elementos estruturais da anatomia funcional no ciclo esquizogônico assexuado de *P. falciparum* durante o estágio extracelular.**

Neste item destacaremos os principais elementos estruturais dos merozoítos, que desempenham funções relacionadas diretamente com as interações parasito hospedeiro:

**a) Róptrias:** são vesículas duplas ligadas a membrana apical dos merozoítos, no formato de uma pêra. A microscopia eletrônica comprovou que as róptrias são compostas de um bulbo basal arredondado e um ducto que o liga à abertura na proeminência apical. As róptrias medem cerca de 550nm de comprimento (RODRIGUES et al., 2008).

**b) Micronemas:** são estruturas menores do que as róptrias que apresentam variações na sua forma e número nas diferentes espécies de *Plasmodium*. São sacos fusiformes com cerca de 120nm de comprimento no caso de *P. falciparum*, ligados numa extremidade com a região apical do merozoíto. Os micronemas estão ligados por uma membrana citoplasmática típica e possuem um interior granular fino que desaparece durante a invasão do merozoíto. É provavelmente que, nesse processo, ocorra a liberação de seu conteúdo e/ou uma fusão de membranas dentro do ducto das róptrias. Evidência estrutural sugere que os micronemas são formados por brotamento a partir do complexo de Golgi. (RODRIGUES et al., 2008).

**c) Grânulos densos:** são vesículas membranosas na forma de esfera, com cerca de 100 - 150nm de diâmetro, descrito em *P. Knowlesi* com aparência semelhante aos de *P. falciparum*, situados entre as róptrias e o núcleo do merozoíto. Os grânulos densos podem se mover em direção a superfície apical da membrana dos merozoítos durante a invasão e produzem uma abertura na membrana plasmática do parasito, lançando seu conteúdo proteico no vacúolo parasitóforo (RODRIGUES et al., 2008).

Pode-se destacar que os micronemas e seus produtos moleculares são aparentemente utilizados no reconhecimento e ligação ao eritrócito no processo de invasão, bem como, eventualmente, na mobilidade do merozoíto.

As róprias e os grânulos densos parecem estar envolvidos na formação do vacúolo parasitóforo, em um possível compartimento (RODRIGUES et al., 2008; ZUCCALA & BAUM, 2011). Algumas das proteínas são descritas conforme seu compartimento na tabela 1.

**Tabela 1:** Localização das principais proteínas antes/durante invasão  
**Via GPI (glicosil-fosfatidil-inositol)**

Nome	Acesso	Possível função
<b>MSP-1</b>	PF3D7_09030300	ND
<b>MSP-2</b>	PF3D7_0206800	Altamente polimórfico provavelmente papel estrutural como revestimento de superfície.
<b>MSP-4</b>	PF3D7_0206900-1	ND
<b>MSP-5</b>	PF3D7_0207000	ND
<b>MSP-10</b>	PF3D7_0620400	ND
<b>Pf 12</b>	PF3D7_0612700	Proteína adesiva
<b>Pf 38</b>	PF3D7_0508000	Proteína adesiva
<b>Pf 92</b>	PF3D7_1364100	ND
<b>PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE PERIFÉRICAS</b>		
Nome	Acesso	Possível função
<b>MSP-9 (ABRA)</b>	PF3D7_1228600	Putativa protease
<b>Pf113</b>	PF3D7_1420700	ND
<b>S-Antigen</b>	PF3D7_1035200	ND; potencial papel imunomodulador
<b>GLURP</b>	PF3D7_1035300	ND
<b>MSP-3</b>	PF3D7_1035400	ND
<b>MSP-6</b>	PF3D_1035500	ND
<b>H101 (MSP-11)</b>	PF3D7_1035600	ND
<b>H103</b>	PF3D7_1035900	ND
<b>MSP-7/like (MSRP2)</b>	PF3D7_1335100/_1334800	ND
<b>MSP-7 DBL-1/2</b>	PF3D7_1036300/_1035700	Liga-se ao receptor desconhecido em eritrócitos
<b>SERA 3-6</b>	PF3D7_0207800/_0207700/_	Domínio de protease de cisteína com serina

	0207600/_0207500	sítio ativo
<b>Pf 41</b>	PF3D7_0404900	<b>Possível</b> proteína adesiva
<b>ROM 1</b>	PF3D7_1114100	Protease romboide, papel provável após a invasão com proteínas na formação de PV
<b>ROM 4</b>	PF3D7_0506900	Protease romboide, se une AMA1, MTRAP, EBL, e PfRh proteínas transmembranárias que atuam durante a invasão.

---

**PROTEÍNAS DO MICRONEMA**


---

<b>Nome</b>	<b>Acesso</b>	<b>Possível função</b>
<b>AMA-1</b>	PF3D7_1133400	Ligante do complexo RON; sinalização.
<b>EBA-175</b>	PF3D7_0731500	Liga-se a glicoforina A provável, papel de sinalização para invasão.
<b>EBA-181/JESEBL</b>	PF3D7_0102500	Liga-se ao receptor desconhecido em eritrócitos.
<b>EBA-140/BAEBL</b>	PF3D7_1301600	Liga-se a glicoforina C em eritrócitos.
<b>EBL-1</b>	PF3D7_1371600	Liga-se a glicoforina B, não-funcionais devido a mutações causando proteína truncada
<b>PTRAM</b>	PF3D7_1218000	ND
<b>PfRipr</b>	PF3D7_0323400	Liga-se a PfRh5
<b>MTRAP</b>	PF3D7_1028700	Putativa proteína motora associada
<b>PTRAM</b>	PF3D7_1218000	Putativa proteína motora associada
<b>SPATR</b>	PF3D7_0405900	ND estágio sanguíneo
<b>GAMA</b>	PF3D7_0828800	Liga-se aos eritrócitos; tem GPI âncora
<b>SUB 2</b>	PF3D7_1136900	Protease que processa MSP-1, MSP-6, MSP-7, AMA1, PTRAMP e outras proteínas do merozoíto ( <i>primer</i> ) para a invasão.
<b>SUB-1</b>	PF3D7_0507500	Protease que processa MSP-1, MSP-6, MSP-7, AMA1, RAP1, MSRP2 e SERAS ao merozoítos para a invasão.

---

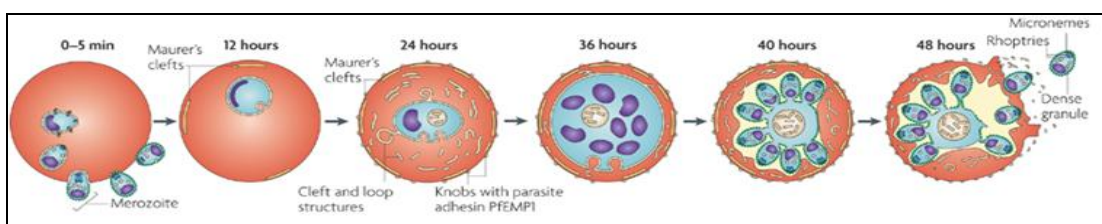
**MSP**, *Merozoite Surface Proteins* 3,6,9,11, **GLURP**, *Glutamate-Rich Protein*, **SERA**, *Serine Repeat Antigen*, **DBL**, *Duffy Binding-Like* - **MSPDBL**-1 e -2, **MSP**, *Merozoite Surface Proteins* 1,2,4,5,10; **Pf**, *Plasmodium falciparum* 12,38,92, (**ROM**), *Rhomboid Protease*, (**PV**), vacúolo parasitoforo, (**AMA-1**), Antígeno Apical de Membrana 1; (**MTRAP**) merozoíto, (**EBL**), (*Erythrocyte Binding Like*), *Thrombospondin-Related Anonymous Protein* (**TRAP**), (**PTRAMP**), *Plasmodium Thrombospondin-Related Apical Merozoite Protein*, **AMA-1**, Antígeno Apical de Membrana 1, **EBL**, (*Erythrocyte Binding Like*); *Thrombospondin-Related Anonymous Protein* (**TRAP**); **PfRipr** *P. falciparum* Rh5 interacting Protein, (**MTRAP**) merozoíto, **PTRAMP**, *Plasmodium Thrombospondin-Related Apical Merozoite Protein*, **SPATR**, *Secreted Protein with an Altered Thrombospondin Repeat*, **SUB-1**, *Subtilisin-like protease*, **ND**, não determinada, (revisado em COWMAN et al., 2012 adaptada).

#### 1.4. Estrutura Maurer's clefts

*Maurer's clefts* (figura 3) são estruturas membranosas utilizadas pelo parasito para exportação de proteínas. Evidências recentes indicam que estas estruturas de origem do parasito foram descobertas por Georg Maurer em 1902, desempenhando um papel fundamental a exportação de proteínas ao citosol e para superfície de eritrócito infectado (MAIER et al., 2009; PRZYBORSKI, 2008).

Um estudo recente (CYRKLAFF et al., 2011) mostrou a conectividade da actina com os *Maurer's clefts* que são estruturas altamente móveis nos parasitos no estágio de anéis e com transição para trofozoítos. A posição da fenda torna-se fixa e com menor rearranjo de remodelação do eritrócito predominantemente por *P. falciparum* e movendo-se para sediar a periferia da célula antes da formação do merozoíto.

Acredita-se que as *Maurer's clefts* podem se originar a partir da membrana do vacúolo parasitoforo e, em seguida, podem formar compartimentos independentes funcionalmente ligados à membrana do eritrócito. Estes compartimentos membranosos não são fisicamente ligados, já que não há continuidade entre as duas camadas em ambos os compartimentos, mas estão ligadas por vesículas. (GRÜRING et al, 2011; HANSSSEN et al, 2008b; TILLEY & HANSSSEN, 2008).

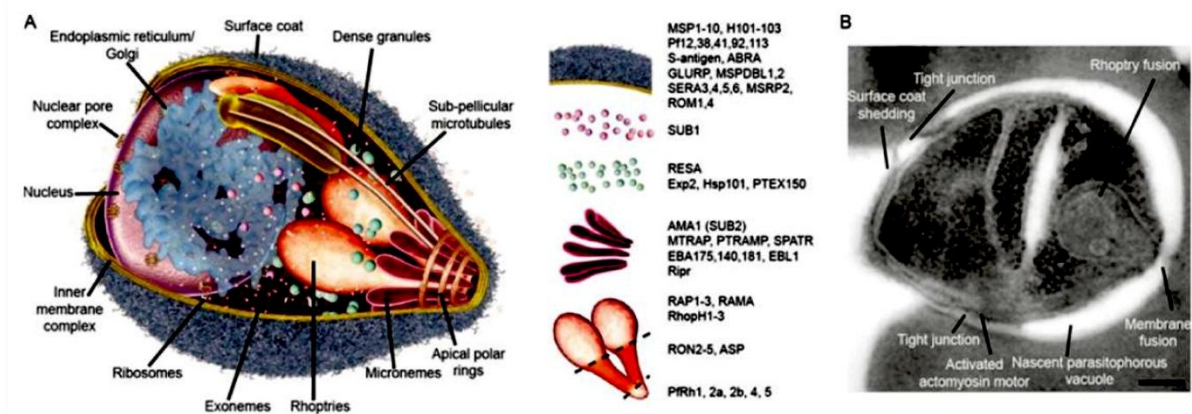


**Figura 3:** Desenvolvimento do *P. falciparum* em eritrócitos (MAIER et al., 2009, adaptado).



### 1.5. Principais proteínas dos merozoítos relacionadas com a interação e invasão dos eritrócitos.

Vários estudos identificaram proteínas dos merozoítos implicadas no complexo evento de invasão de eritrócitos, algumas situadas na superfície do merozoíto (figura 4A-B) enquanto outras foram localizadas nas róptrias em particular, micronemas, grânulos densos tendo participação no remodelamento do eritrócito infectado.



**Figura 4:** (A) Esquema tridimensional do merozoíto e organelas. (B) Merozoíto de *P. falciparum* em processo de invasão (COWMAN et al., 2012).

Algumas das proteínas que regulam invasão dos merozoítos podem ser divididas em duas classes:

- adesinas que funcionam como ligantes diretamente a receptores específicos no eritrócito;
- invasinas, com função no processo invasivo, mas não necessariamente ligam diretamente aos receptores na célula hospedeira.

As adesinas estão localizadas em ambos os micronemas e róptrias, e são, em geral, específico do *Plasmodium* (THAM et al., 2012; COWMAN & CRABB, 2006).

As principais adesinas identificadas são: as (eritrócitos *binding like*) - EBL e as RBL (*reticulocyte binding-like*) homólogas (PfRh 1,2a,2b,4,5): localizadas nas micronemas e *neck rhoptries*, respectivamente (DURASINGH et al., 2003, RAYNER et al., 2000, SIM et al., 1990). Diferentes membros das adesinas ligam-se a receptores específicos, com EBA-175,

---

EBL-1, e EBA-140 (descrita como BAEBL) ligando-se as glicoforinas A, B, e C, respectivamente (MAYER et al., 2009; LOBO et al., 2003; SIM et al., 1994).

Essas proteínas foram agrupadas e denominadas de DBL-EBL e incluem em *P. falciparum* a família de genes que codificam produtos EBL tais como: EBA-175, EBA-140, EBA-181, EBA-165 e é provável durante a invasão que elas funcionam de uma maneira análoga, a MAEBL localizada nas róprias e micronemas. (COWMAN & CRABB, 2006).

Na etapa durante a invasão, desde o reconhecimento e adesão reversível do merozoíto à membrana do eritrócito, foram percebidas mudanças ocorrem na superfície do merozoíto, quando se dá o envolvimento de várias moléculas entre as das famílias de proteínas descritas na (tabela 1) como *Merozoite Surface Proteins* (MSP). Desse modo, a partir da primeira delas descrita como a MSP (*Major Surface Antigen*), (HOLDER, 1988; HOLDER & FREEMAN, 1982).

A primeira a ser identificada como MSP-1 é descrita como muito abundante e é, funcionalmente, uma proteína conservada. Além disso, está associada com a membrana do parasito ancorada via GPI (glicosil-fosfatidil-inositol). A MSP-1, apesar de muito bem caracterizada como proteína de membrana, sintetizada como um precursor de elevada massa molecular (180 a 230kDa) no estágio esquizogônico, e, durante o processo de invasão do eritrócito, sofre um processamento gerando fragmentos menores de 19kDa e 42kDa, dos quais apenas o de 19kDa permanecem na superfície do parasito que penetra no eritrócito. (COWMAN et al., 2012, RODRIGUES et al., 2008; COWMAN & CRABB, 2006).

As localizações subcelulares de cada proteína e os seus subcompartimentos dentro das organelas secretoras como das róprias (em particular) provavelmente desempenham um papel coordenado (RICHARD et al., 2010).

Isso pelo fato de ocorrer uma segregação de proteínas o que permite a cada uma ser armazenada e liberada, num período exato de tempo, que possa gerar complexos funcionais de invasão e expor ao sistema imune (CHEN et al., 2011; BESTEIRO et al., 2009; ALEXANDER et al., 2006).

### 1.5.1. Proteínas das Róptrias

Outras famílias de proteínas associadas às róptrias desempenham um papel essencial em *Plasmodium* durante a invasão dos merozoítos na célula hospedeira. Entre a família destacam-se: as principais proteínas associadas às róptrias: PfRBP-H1, PfRBP-2Ha, PfRBP-2Hb; RAP-1, RAP-2, RAP-3 e a família das RhopH. Algumas destas proteínas podem se perder durante a ruptura do esquizonte ao liberar os merozoítos, outras podem ser transferidas para a membrana do eritrócito durante a invasão (RODRIGUEZ et al., 2008).

### 1.5.2. As Proteínas RAP-1, RAP-2, RAP-3

As proteínas localizadas na extremidade apical do merozoítos estão envolvidas na invasão dos eritrócitos, podem formar complexos não covalentemente ligados. RAP-1 e RAP-2 contendo um peptídeo sinal N-terminal, indicando encaminhamento para organelas a partir do retículo endoplasmático. RAP-1 podendo estar envolvida num mecanismo de invasão alternativo (RODRIGUES et al., 2008).

### 1.5.3. *Neck Rhoptry Protein* (RON 2-5)

Proteína localizada no ducto do merozoíto que participa da fase de contato e estabelecimento da junção estável que precede a invasão deste. As proteínas RON são encontradas em todos os membros da ordem Apicomplexa e evolutivamente deram origem as outras famílias da róptrias (ZUCCALA & BAUM et al., 2011).

### 1.5.4. Proteínas do complexo RhopH

Após contato do merozoíto com a superfície do eritrócito, ocorre todo um processo de sinalização em cascata pelo qual o parasito descarrega seus produtos para estabelecer uma junção com as moléculas da superfície do eritrócito. Na sequência, ocorre a secreção das moléculas localizadas nas organelas que desempenham um papel chave durante o processo de invasão, sendo um destes componentes o complexo de proteínas denominadas de RhopH (tabela 2), (KATS et al., 2006; RUNGRUANG et al., 2005; SAM-YELLOWE et al., 1991).

No complexo de proteínas envolvidas nas róptrias, descritas em *P. falciparum* foram definidos dois complexos RhopH: o de elevado peso molecular composto de RhopH1(155 kDa), RhopH2 (140 kDa) e RhopH3 (110 kDa) e outro de baixo peso molecular, complexo

composto de *protein associated rhoptry* - RAP1 (PF 14-0102), RAP2 (PFE0080c) e RAP3 (PF0075c) (KANEKO et al., 2007; HIENNE et al., 1998; COOPER et al., 1988; LUSTIGMAN et al., 1988; HOWARD et al., 1984).

Os genes descritos no complexo de elevado peso molecular, foram identificados em *P. falciparum* e homólogos em parasitos da malária de roedores *P. yoelii*, designados atualmente ‘RhopH1/CLAG’ (proteínas) e ‘*rhop1/clag*’ (gene), (*Cytoadherence-Linked Asexual Gene* (RhopH1/CLAG), que será discutido no item 8. (KANEKO et al., 2007).

Na RhopH 1/CLAG foram relatados três membros *rhop1/clag* denominados: *clag2* (PFB0935w), *clag3.1* (PFC0120w) e *clag9* (PlasmoDB IDPFI1730w/NCBI GI:167963009). No entanto, pode envolver nesse evento a participação de outros componentes do complexo *clag3.2* (PFC0110w), *clag8* (MAL7P1.229), que foi designado *clagb1* (de *clagBlob*, *clagb*, *clag7*) conforme dados do projeto genoma de *P. falciparum* (ALEXANDRE et al., 2011; IRIKO et al., 2008; KANEKO et al., 2007; LING et al., 2004).

**Tabela 2:** Proteínas *Neck Rhoptry*

Nome	Acesso	Putativa função
<b>PfRh 1</b>	PF3D7_042300	Liga-se às células vermelhas através de receptor Y
<b>PfRh 2a</b>	PF3D7_1335400	Liga-se às células vermelhas através de receptor Z
<b>PfRh 2b</b>	PF3D7_1335300	Liga-se às células vermelhas através de receptor Z
<b>PfRh 4</b>	PF3D7_0424200	Liga-se às células vermelhas através de receptor do complemento 1
<b>PfRh 5</b>	PF3D7_0424100	Liga-se aos eritrócitos através Basigina
<b>RON 2</b>	PF3D7_1452000	Inserida na membrana dos eritrócitos na invasão, formas complexas em junção com proteínas RON e AMA-1.
<b>RON 3</b>	PF3D7_125100	Provavelmente forma um complexo, junção com outras proteínas RON e AMA-1.
<b>RON 4</b>	PF3D7_1116000	Injetada em eritrócitos, liga-se RON2 e forma um complexo em junção, com proteínas RON e AMA-1
<b>RON 5</b>	PF3D7_0817700	Formas complexas de junção com proteínas RON e AMA-1.

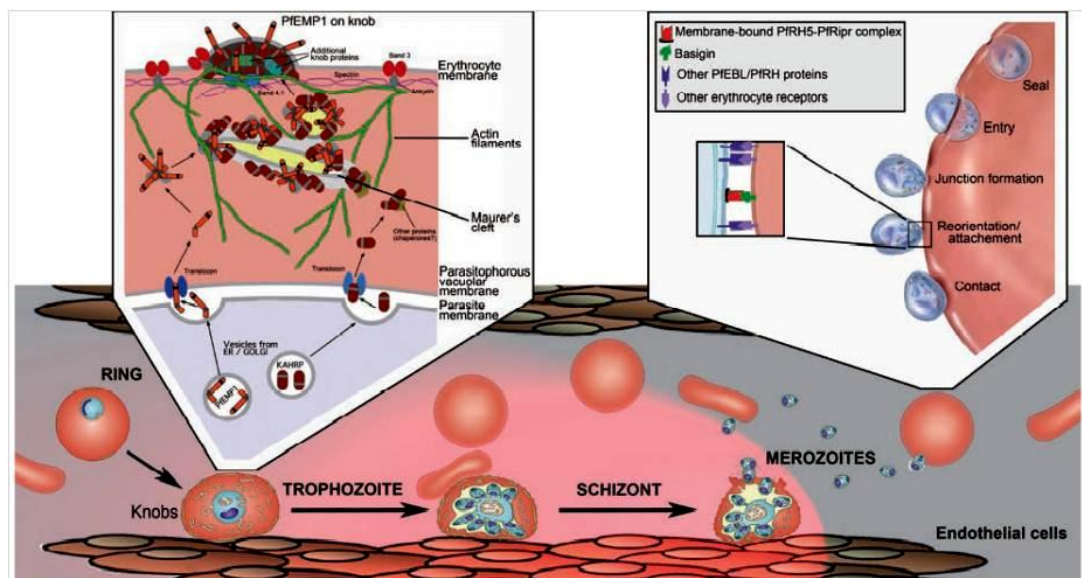
PfRh, (*Reticulocyte Binding-Like*) homólogos (1,2a,2b,4,5); RON, (*rhoptry Neck*), **ASP**, *Apical Sushi Protein*, (revisado em COWMAN et al., 2012 adaptada).

### 1.6. Anatomia funcional do eritrócito parasitado *P. falciparum*

A principal alteração foi inicialmente descrita como a formação de estruturas eletro densa (figura 5), e ocorre na membrana do eritrócito após a invasão do merozoíto se desenvolver rapidamente em algumas horas, culminando com a formação dos *knobs*.

Os *knobs* são complexos moleculares formados por associações de proteínas originais do citoesqueleto do eritrócito e proteínas neo-sintetizadas pelo parasito no processo de remodelagem, a saber, as KAHRP (*Plasmodium falciparum Knob-Associated Histine-Rich Protein*) e as PfEMP2 e PfEMP3 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Proteins 2 e 3*), (WELLEMS & FAIRHURST, 2012).

Ao complexo molecular dos Knobs associa-se outra proteína de origem parasitaria, a PfEMP1. De estrutura transmembranaria é a principal responsável no grupo de famílias multigênicas ao mesmo tempo pela variação antigênica e pela citoaderência do *P. falciparum* (KIRKMAN & DEITSCH, 2012).



**Figura 5:** Citoaderência do eritrócito parasitado adaptado (WELLEMS & FAIRHURST, 2012).

### 1.6.1. Citoaderência

Durante a fase de desenvolvimento do parasito dentro dos eritrócitos, metabolicamente ativo, torna-se capaz de aderir às células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. O parasito faz várias alterações dentro da célula hospedeira. O processo de adesão sequestra os eritrócitos infectados prevenindo a sua eliminação no baço. Esta interação ocorre durante os estágios de trofozoítos maduros, esquizontes e gametócitos do *Plasmodium*, e envolvendo o bloqueio dos vasos sanguíneos, a interação entre os eritrócitos parasitados e receptores das células endoteliais, incluindo a resposta inflamatória local (CHAKRAVORTY et al., 2008).

O termo citoaderência pode ser utilizado para designar, além de adesão ao endotélio, adesão de eritrócitos parasitados a outros eritrócitos infectados (autoaglutinação) e até mesmo a aderência a outro eritrócito não infectado (figura 5), via receptores presentes na superfície do eritrócito, como exemplo, os fatores sanguíneos e o receptor de complemento CR1 (*rosetting*). O fenótipo denominado de *rosetting* tem sido associado à malária grave (WELLEMS & FAIRHURST, 2012; ROWE et al., 2000). As células endoteliais expressam uma grande variedade de receptores adesivos que podem ser reconhecidos por ligantes na interação parasito - endotélio. (tabela 3)

Estudos recentes relatam um fenômeno de citoaderência equivalente em *P. vivax*, apesar de ocorrer em menor quantidade (COSTA et al., 2011; CARVALHO et al., 2010).

A citoaderência é mediada por várias proteínas do parasito entre as quais se destacam as proteínas PfEMP-1, codificadas nos genes *var*. Estas proteínas foram observadas no início da década dos anos 80 do século passado (LEECH et al., 1984), descrita como proteínas de elevado peso molecular de *P. falciparum*, considerada a maior responsável pelo sequestro de eritrócito infectado em capilares sanguíneos e órgãos do hospedeiro vertebrado (BARUCH et al., 2002).

### 1.7. Genes *var* e seus produtos PfEMP-1

Os genes *var* inicialmente descrito por três grupos de pesquisa independentes, possuem 2 exons, o primeiro exon codifica um grande domínio extracelular e uma pequena região transmembrana e o segundo exon codifica a região C terminal, uma região intracelular relativamente conservada denominada *acidic terminal segment* (ATS). O ectodomínio

contém o segmento terminal acompanhado de outros elementos como domínio *Duffy Binding-Like domain* (DBL), *Cysteine-Rich Inter Domain* (CIDRS) e C2 (AUTINO et al., 2012; BARUCH et al., 1996; SMITH et al., 1995; SU et al., 1995).

**Tabela 3:** Alguns estudos com moléculas de adesão envolvidas na citoaderência.

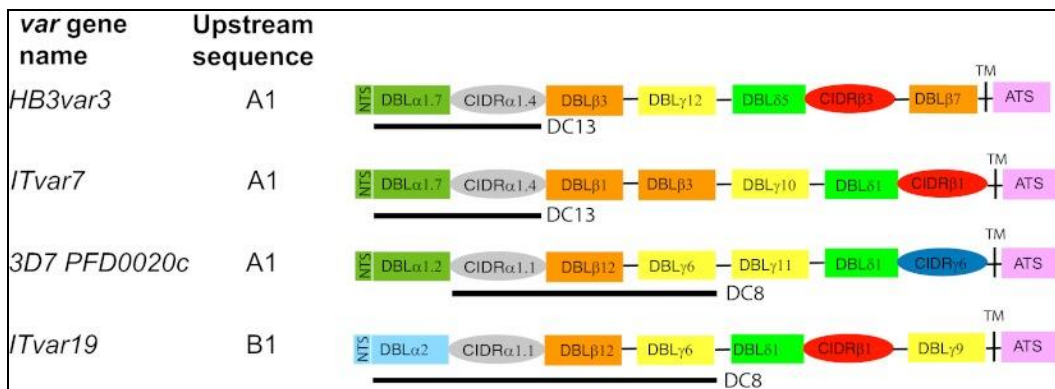
Moléculas de adesão do hospedeiro	Alvo Celular	Ligantes do Parasito	Estudos
TSP	Endotélio	Band 3 modificado	(1)
		PfEMP1	(2)
CD36	Endotélio, céls. dendríticas ENP	CIDR $\alpha$	(3)
ICAM-1/CD54	Endotélio	DBL $\beta$ C2	(4)
			(5)
VCAM-1/CD106, $\alpha\gamma\beta$	Endotélio	ND	(6)
			(7)
CSA	Endotélio placenta	DBL $\gamma$	(8)
			(9)
P/E-Selectina (CD62 E)	ND	PfEMP1	(10)
PECAM- 1(CD31), NCAM	ND	CIDR $\alpha$ /DBL $\delta$	(11)
IgG não imune	Placenta	-	(12)
CR1, HS-like GAG, Grupo sanguíneo Ag A	Eritrócito não parasitado	DBL $\alpha$	(13)
gC1qR /IgM	Eritrócito não parasitado	ND	(14)

**Abreviações:** TSP = Trombospondina, ICAM-1 = *Intercellular Adhesion Molecule 1*, VCAM-1 = *Vascular Cell Adhesion Molecule*, CSA = *Sulfato de Condroitina A*, CD36 = *Cluster Differentiation*, PECAM-1 = *platelet/EC adhesion molecule*, NCAM = *Neural Cell Adhesion Molecule*, gC1qR = *globular C1q receptor*.

**Estudos:** (1) ROBERTS et al.,1985, (2) EDA et al.,1999, (3) URBAN et al., 2001, (4) BARUCH et al.,1996, (5) BERENDT et al.,1989, (6) OCKENHOUSE et al.,1992, (7) SIANO et al.,1998, (8) GOEL et al., 2010, (9) REEDER et al.,1999, (10) SENCZUK et al., 2001, (11) CHEN et al., 2000, (12) FLICK et al., 2001, (13) CHEN et al.,1998, (14) CRAIG et al., 2012.

No genoma de *P. falciparum* com aproximadamente 60 genes *var* estão distribuídos ao longo dos 14 cromossomos que compõe (22.8 Mb) no isolado 3D7 e em outras cepas, sendo possível encontrar genes *var* em regiões subteloômicas ou centrais e que podem variar de tamanho de 0.7 a 3.4Mb. No segmento N-terminal possuem um motivo conservado PEXEL/VTSn (MARTI et al., 2004; HILLER et al., 2004), que indica que esta proteína será exportada para a membrana.

As proteínas PfEMP-1 têm uma organização modular, consistindo em vários números e combinações de domínios DBL com diferentes tipos ( $\alpha, \beta, \gamma, \epsilon, \delta, x$ ) e CIDR também de diferentes classes ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), (figura 6). A constituição dessas proteínas é muito variável, tanto em termos de número total de domínios que a compõem, quanto a sua organização estrutural, embora seus promotores sejam bastante conservados (KRAEMER & SMITH, 2003; CRAIG & SHERF 2001; FREITAS-JUNIOR et al., 2000). Há a percepção que alguns genes *var* mais conservados codificam proteínas PfEMP-1 associadas com evoluções para malária grave, seja gestacional ou cerebral (CLAESSENS et al., 2012; LAVSTSEN et al., 2012).



**Figura 6:** Esquema da estrutura da PfEMP1 (adaptada de CLAESSENS et al., 2012).

### 1.8. Família *Clag* (*Cytoadherence linked asexual gene*)

Um gene candidato na década de noventa foi originalmente identificado em um estudo de linhagens de parasitos contendo o cromossomo truncado, descrito como resultado de deleções subteloômicas do cromossomo (figura 7). Estudos envolvendo o mapeamento dessas regiões das sequências, responsável pela adesão ao receptor CD36 e/ou um papel



crítico na gametogênese foram identificados (CHAIYAROJ et al., 1994; KEMP, 1992; SHIRLEY et al., 1990).

A expressão de ambos os fenótipos foi mapeado em uma região subtelomérica 0,3 Mb, e o produto do gene associado a citoaderência foi localizado dentro de uma região de 55 kb, (DAY et al., 1993). Os pontos de interrupção das eliminações em vários isolados do parasito *in vitro* independentes foram encontrados agrupados em torno de uma região denominada de *breakpoint open reading frame*, (bporf). A função de bporf é desconhecida, mas a região distal do cromossomo nove parece conter um gene cujo produto é necessário para citoaderência, e este não era um gene *var* (BARNES et al., 1994).

O mapeamento da região deletada e a análise das sequencias revelou um gene candidato, transcrito nos estágios sanguíneos assexuados e possui aproximadamente 7kb, supostamente nove exons e localiza-se no cromossomo 9, sendo transcrito em todos os estágios dos parasitos, com a transcrição máxima a cerca 42 horas após a invasão e traduzido em uma proteína de 150-160 kDa (GARDINER et al., 2000; HOLT et al., 1998; BARNES et al., 1994).

O gene desconhecido foi identificado *clag9* (*Cytoadherence linked asexual gene*) e foi sugerido que o produto do gene é essencial para a ligação de eritrócitos infectados com o receptor CD36 (HOLT et al., 1999; TRENHOLME et al., 2000a).

Uma abordagem complementar aos estudos foi realizada utilizando a tecnologia da transfecção e demonstrou uma ligação reduzida das células de melanoma C32 (expressando o receptor CD36), um efeito que foi revertido após a remoção do plasmídeo. *Clag9* foi inicialmente descrito como tendo um papel na citoaderência e recebeu o nome devido a uma marca de cola australiana, (CRAIG, 2000).

Outros genes relacionados foram identificados após o sequenciamento desta região durante o projeto de sequenciamento do *P. falciparum* (GARDNER et al., 2002). Foram descritos cinco genes em cromossomos diferentes, dos quais foram respectivamente identificados de acordo com sua localização na família multigênica como: *clag2*, *clag3.1* e *clag3.2*, *clag8* e *clag9* (HOLT et al., 2001, 1999).

Tendo em vista a identificação do gene *Pfclag9*, foram propostos três modelos descritos (CRAIG & SCHERF et al., 2001; CRAIG, 2000; TRENHOLME et al., 2000b).

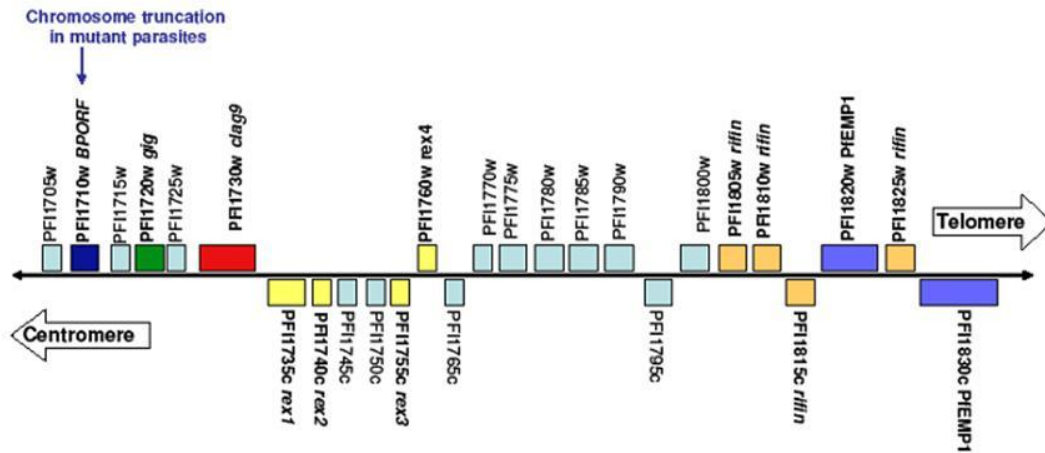
- (I) O *Clag9* que pode estar envolvido no fenômeno de citoaderência ligando-se diretamente ao receptor CD36;
- (II) Relacionado indiretamente com função acessória;
- (III) Com um papel importante no transporte de PfEMP1 até a membrana do eritrócito;

Ressalte-se que através da predição da sua estrutura, foi observado que pode conter quatro domínios transmembranas, com possível exposição no lado externo do eritrócito parasitado. A precisa localização celular desta proteína ainda não foi determinada, sendo assim ela pode estar implicada na citoaderência. Até hoje, existem poucas informações sobre as características bioquímicas da proteína.

Durante o evento de citoaderência, dos quais participam os estágios dos parasitos de trofozoítos e esquizontes que se manifestam entre 16 - 20 horas (trofozoítos maduros) após a invasão, no entanto, estudos, demonstraram que o gene *clag9* é transcrito durante o ciclo assexuado, quando a proteína é também sintetizada. Após a invasão dos eritrócitos, a proteína parece ser transferida para a fase de anel. (LING et al., 2004).

Outros estudos, demonstraram que a proteína CLAG9, pode estar envolvido com proteínas das róprias de merozoítos, formando um complexo de proteínas que possuem elevado peso molecular (RhopH) que contém três proteínas que estão associadas não covalentemente e foram denominadas RhopH 1, 2 e 3. Os genes que codificam RhopH 2 e 3 são genes de cópia única no cromossomo 9 (GARDINER et al., 2004; LING et al., 2004; KANEKO et al., 2001).

A proteína, RhopH1 foi descrita como sendo codificado por um ou por ambos os genes *clag* (3.1 e 3.2) localizados no cromossomo 3. Baseado nesta associação foi renomeado a família multigênica '*clag*' para '*rhopH1/clag*' gene, o que sugere que outros genes da família Clag possam também estar envolvidos (KANEKO et al., 2007, 2005; COOPER et al., 1988; LUSTIGMAN et al., 1988; HOWARD et al., 1984).



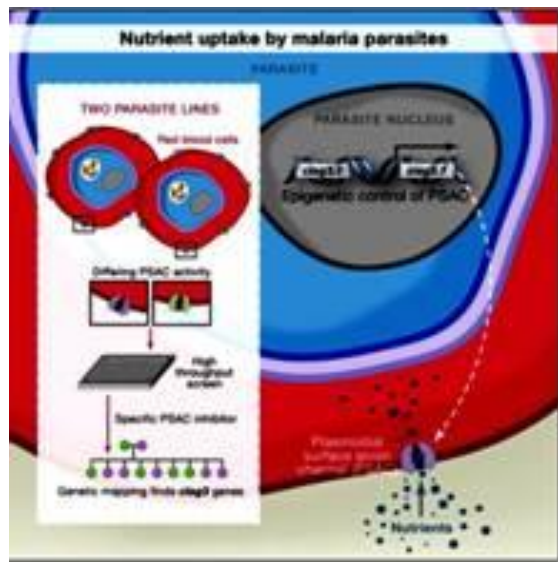
**Figura 7:** Esquema do telômero do cromossomo 9: ■ PFI1730w (*Pfclag9*), ■ (PFI1710w) BPORF região truncada nos parasitos mutantes, outros genes em ■ o PFI1705w, PFI1715w, PFI1725w, PFI1745c, PFI1750c, PFI1765c, PFI1770w, PFI1775w, PFI1780w, PFI1785w, PFI1790w, PFI1795c, PFI1800w, ■ o PFI1735c *rex1*, PFI1740c *rex 2*, PFI1755c *rex3*, PFI1760w *rex4*, ■ (em laranja) PFI1805w *rifin*, PFI1810w *rifin*, PFI1815c *rifin*, PFI1825w *rifin*, ■ (em azul) PFI1820w PfEMP1, PFI1830c PfEMP1, ■ (em verde) PFI1720w *gig*, *cluster* de genes adjacentes alguns com funções desconhecidas (MATTEI, D., 2008, adaptado).

Considerando um papel importante da família dos genes *clag* nas etapas do ciclo assexuada do *P. falciparum*, incluindo a invasão de eritrócitos e a remodelagem do eritrócito infectado, a participação da proteína CLAG9 no desenvolvimento de imunidade à malária falciparum também foi investigada em Papua Nova Guiné e observou-se uma direta correlação entre o título elevado de anticorpos contra peptídeos sintéticos representando epítomos lineares da proteína CLAG9 de *P. falciparum* e a presença de imunidade em crianças e adultos (TRENHOLME et al., 2005).

A proteína CLAG9, descrita com aproximadamente 1340 resíduos de aminoácidos e sugere-se 155-160 kDa, contendo peptídeo sinal (Signal P), sequência sinal (SS), resíduos conservados de cisteínas entre os resíduos 18-19 e domínio transmembrana (TMD) entre as regiões 247 a 264 está ainda em discussão (PIZÓN et al., 2010; BENDTSEN et al., 2004).

### 1.8.1. CLAG3.1 e CLAG3.2

Os estudos atuais sobre o papel funcional de PfCLAG3, demonstraram por meio de experimentos genéticos, utilizando clones obtidos a partir do cruzamento entre as linhagens HB3 x Dd2 de *P. falciparum* (WALLIKER et al., 1987), que revelaram a participação direta ou indireta do produto do gene *clag3* na formação do *Plasmodial Surface Anion Channel* (PSAC), (figura 8) essencial à captação de aminoácidos e outros produtos nutritivo do plasma pelo parasito, (NGUITRAGOOL et al., 2011).



**Figura 8:** Esquema de modelagem funcional proposta do *Plasmodial Surface Anion Channel* (PSAC), (NGUITRAGOOL et al., 2011, adaptado).

O tráfego da proteína PfCLAG3 após a injeção no citosol, por meio da membrana do vacúolo parasitóforo até o destino final na membrana do eritrócito infectado foi demonstrado. Aparentemente, a proteína PfCLAG9 também é injetada no eritrócito, mas sua função na remodelação da célula hospedeira é atualmente desconhecido.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral:**

Estudar o envolvimento do *clag9* (*cytoadherence linked asexual gene*) durante a remodelação do eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* e sua participação no desenvolvimento da imunidade em malária.

### **2.2. Objetivos específicos:**

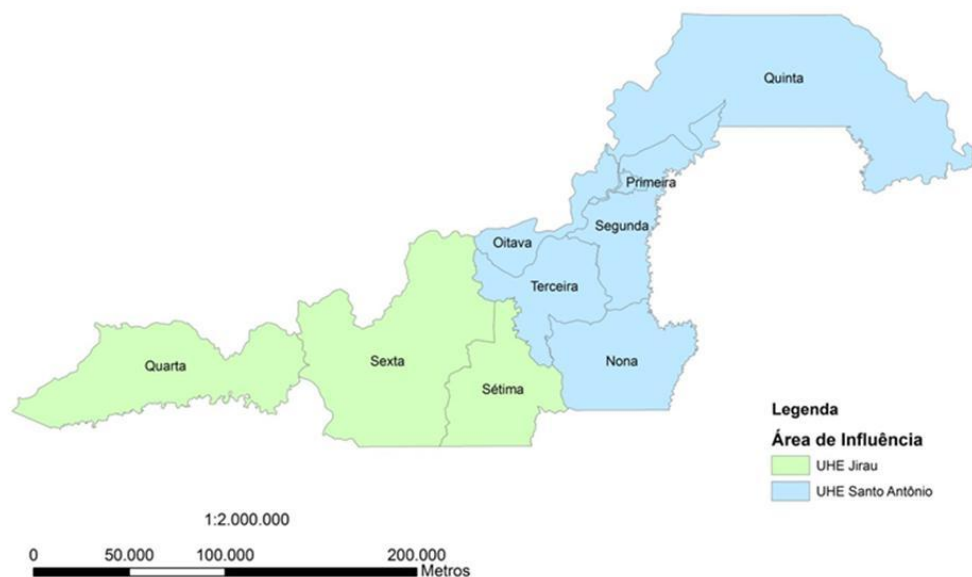
- a) Avaliação comparativa da expressão do gene *Pfclag9* em isolados naturais de parasitos *P. falciparum* da região endêmica de Porto Velho em parasitos citoaderentes em diferentes receptores endoteliais contidos na linhagens celulares CHO<sub>CD36</sub>, CHO<sub>CSA</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub>.
- b) Inferir função como antígeno-alvo importante pela avaliação da conservação de sequências do gene *Pfclag9* em diferentes isolados naturais de *P. falciparum* e em linhagens desses, selecionados para citoaderência a diferentes receptores endoteliais.
- c) Avaliação da participação da proteína CLAG9 e suas ortólogas de *Plasmodium vivax* nas características das respostas imunológicas humorais em pacientes com malária em área endêmica de Porto Velho e suas relações com a imunidade clínica à malária.



### 3.1. Área e população do estudo

As amostras biológicas descritas neste estudo, bem como os isolados de *P. falciparum* analisados, foram obtidas de indivíduos que residiam no município de Porto Velho, capital do Estado de Rondônia (PVH), que está localizada em uma área de 34.096.429 Km<sup>2</sup> no meio da Floresta Amazônica brasileira. O município está situado na região noroeste do Estado de Rondônia, entre a latitude 8°47'01'' S e longitude de 63°55'56'' W, com altitude de 85m, em relação ao nível do mar, ao longo do Rio Madeira, o principal afluente da margem direita do Rio Amazonas que atravessa o Município de uma ponta a outra.

O município está dividido em nove regiões operacionais para o controle de malária de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde (SEMUSA). Importante ressaltar que 80% da população residem na área urbana, correspondente a primeira região um (figura 9). A população de Porto Velho, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE coletados no ano de 2010, foi estimada em 428.527 habitantes, e apresenta elevada taxa de crescimento populacional em função da construção das Hidrelétricas do Rio Madeira.



**Figura 9.** Mapa do município de Porto Velho - Rondônia com divisões de áreas de influências das Usinas Hidrelétricas (UHE) Jirau e (UHE) Santo Antônio, (SEMUSA, 2008), (PIERONI & COSTA, 2010).



### 3.2. Amostras biológicas de pacientes

Foram coletados 10 ml de sangue por punção venosa de pacientes, com hematoscopia positiva para malária, com os sintomas clínicos característicos da patologia, atendidos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPET. O material biológico foi fracionado e os soros foram armazenados em tubos estéreis, e, posteriormente, criopreservados a -20°C.

Foram obtidas amostras de soros oriundos de cortes epidemiológicos de estudos realizados na população ribeirinha por KATSURAGAWA et al. (2010, 2009) e TADA et al. (2007). Os perfis das amostras cedidas constam de pacientes portadores sintomáticos e assintomáticos que foram previamente selecionados, de quatro trechos das comunidades ribeirinhas do Rio Madeira: Cachoeira de Santo Antônio, Cachoeira de Teotônio; Vila Amazonas e Cachoeira de Jirau, Abunã e Santo Antônio (Bairro Santo Antônio), no município de Porto Velho, (figura 9).

Foram utilizados controles negativos, dos quais, sessenta e quatro (n=64) amostras provenientes de banco de sangue. Trinta e duas amostras foram coletadas no banco de sangue do interior de São Paulo de pacientes que em tese, nunca sofreram exposição a qualquer forma de propagação e contágio da malária; bem como trinta e duas amostras foram coletadas na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Rondônia (FHEMERON), de pacientes que relataram nunca ter sido infectado por *Plasmodium*.

#### 3.2.1. Locais de Coleta:

**a) - Comunidades Ribeirinhas:** Amostras foram provenientes do trecho entre as cachoeiras de Teotônio (TE) margem direita (TE - MD 08°51'40,3''S, S 64° 03'43,2''W) e esquerda (TE ME 08° 51'10,0''S, 64°03'51,7''W); Jaci Paraná, urbano e rural, (Trecho Jirau – Abunã e trecho Mutum Paraná. As amostras destas áreas foram selecionadas e agrupadas por apresentarem padrão semelhante, sendo amostras de *P. vivax* e de *P. falciparum* de evoluções assintomáticas.

**b) - Comunidade Santo Antônio:** É uma comunidade ribeirinha do Rio Madeira, próxima à área urbana da cidade, aproximadamente a sete quilômetros da região central de Porto Velho, localizando-se na margem direita da Cachoeira de Santo Antônio (08°48'34,6''S 63° 56'34,3''W). Desta comunidade foram selecionados pacientes doadores positivos para formas assintomáticas de *P. vivax* e *P. falciparum*.

c) - **Vila Candelária** (Candelária): se situa na área urbana da cidade de Porto Velho, à margem direita do Rio Madeira (8°47'08''S, 63°55'04''W), à aproximadamente três quilômetros da área central da cidade em direção a cachoeira Santo Antônio (sudoeste da cidade). Desta localidade foram selecionadas amostras de pacientes com malária assintomática por *P. vivax* e *P. falciparum*.

d) - **Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM)** - Foram coletadas amostras dos pacientes atendidos com malária patente causada por *P. falciparum* e *P. vivax*.

Todos os doadores de amostras aceitaram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e formulário individual. (Anexo I e Anexo II).

### 3.2.2. Extração de DNA e Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

As amostras foram previamente selecionadas e utilizadas para pesquisa de *Plasmodium sp.*, por hemoscopia através de gota espessa e esfregaço, duas lâminas por amostra. O concentrado de eritrócitos das amostras, de cada localidade, foi extraído utilizando o Kit *GE Healthcare, blood genomic Prep Mini Spin Kit* (GE), de acordo com as recomendações do fabricante e confirmadas utilizando *Nested PCR*.

As sequências dos oligonucleotídeos específicos para gênero e espécie do *Plasmodium* estão descritos na tabela 4 e os fragmentos gerados na PCR foram visualizados em gel de agarose 2% com brometo de etídio, conforme descrito (SNOUNOU, 1996). As reações foram realizadas no equipamento Gene Amp PCR System 9700, *Perkin Elmer*.

Para fins de identificar e controlar contaminações de cultivos de *P. falciparum* por *Mycoplasma sp.*, foram conduzidos PCRs utilizando oligonucleotídeos mencionados na tabela 4.

**Tabela 4:** Iniciadores da região do gene *Pfclag9*, do *Plasmodium* e *Mycoplasma sp.*

<b>Código ID/pb</b>		<b>Código</b>	<b>Sequências</b>
<b>PFI1730w</b> <b>(240pb)</b>	UExon	<i>mclag</i> F	5'- catggttggcccttctcgtt - 3'
		<i>mclag</i> R	5'- ccattgcttcttcgtaag - 3'
<b>Plasmo</b> <b>(Gênero)</b> <b>1200pb</b>	Rplus	Rplus F	5'- ctgttggtgccttaaacttc - 3'
		Rplus R	5' - ttaaaattgtgcagttaaaaaacg - 3'
<b>Fal</b> <b>(espécie)</b> <b>205pb</b>	Fal	Rfal F	5'- ttaaactggttgggaaaaacaaaatatatt-3'
		Rfal R	5'acacaatgaactcaatcatgactaccgctc-3'
<b>Viv</b> <b>(espécie)</b> <b>120pb</b>	Viv	Rviv F	5'- cgcttctagcttaaatccacataactgatac - 3'
		Rviv R	5'- actccaagccgaagcaaagaaagtcccta-3'
<b>Myc sp</b> <b>(300-400pb)</b>	Myc	Myc F	5'- ggcgaaatgggtgagtaacaccg -3'
		Myc R	5'- cggataacgcttgcgacctat -3'

Abreviações: ID = identificação, Pb = pares de base, , *Plasmo* = *Plasmodium*, (gênero), *Fal* = *falciparum*, *Viv* = *vivax*, *Myc* = *Mycoplasma sp*

### 3.3. Ensaios *in vitro*

#### 3.3.1. Isolados de *P. falciparum* e linhagens de células *Chinese Hamster Ovary*.

As cepas de *P. falciparum* utilizadas neste estudo foram: a 3D7 clone do isolado NF54, doada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade São Paulo (ICB-USP), via MR4 (Dr. David Walliker), e a cepa Dd2 obtida em 1979 no sudeste asiático partir da amostra de um paciente, foi cedida do laboratório do Prof. Dr. Mariano Gustavo Zalis, Universidade Federal do Rio de Janeiro - (UFRJ).

#### 3.3.2. Isolamento das amostras dos pacientes com *P. falciparum*

Foram cultivados *in vitro* seguindo o método descrito por (TRAGER & JENSEN, 1976). A suspensão de eritrócitos parasitados foi colocada em cultura em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de plasma humano tipo O+ e 10% de bicarbonado de sódio (NaHCO<sub>3</sub>).

Os eritrócitos (O+) foram lavados e adicionados à cultura obtendo-se um hematócrito de 5%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C com trocas diárias de meio e manutenção em ambiente de mistura gasosa composta por 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90 % de N<sub>2</sub>. A parasitemia foi monitorada rotineiramente mediante microscopia de esfregaços corados com os componentes do Kit Panótico Rápido (Laborclin).

Quando a parasitemia dos cultivos alcançava valores entre 5-8%, as culturas eram diluídas ou amplificadas até os estágios de trofozoítos maduros de interesse. O Plasma humano (O+) utilizado na cultura dos parasitos foi gentilmente cedido pela (FHEMERON). Cada lote de plasma foi previamente testado e inativado a 56°C durante 30 minutos. A fibrina, presente no plasma foi precipitado por centrifugação (3.000x g durante 15 minutos à 4°C) O plasma foi criopreservado em alíquotas à -20°C até o momento de uso.

### **3.4. Criopreservação dos parasitos**

Os eritrócitos parasitados foram congelados no estágio de trofozoítos jovens com parasitemia acima de 5%, foram centrifugados 3500 rpm, 5 minutos em temperatura ambiente, e o volume de eritrócitos sedimentados foi medido. Em seguida 1,66 volumes de glicerolite estéril foram adicionados lentamente sobre delicada agitação usando-se um vortex. A solução foi transferida para criotubos que foram criopreservados a - 80°C durante pelo 24h e em seguida transferido para nitrogênio líquido, como descrito em (MOLL et al., 2008).

Para o descongelamento cada amostra dos parasitos foi retirada do nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido e o descongelamento realizado em gelo gradativamente até o descongelamento. Os eritrócitos infectados foram então transferidos para tubos de 15 ml.

Em seguida adicionado cloreto de sódio (NaCl) 12% (1/5 de volume do precipitado do congelamento) foi adicionado lentamente sob agitação. Após incubação durante 1 minuto em temperatura ambiente, foram adicionados 10 volumes de NaCl 1,6%, novamente sobre agitação leve e constante. Após, os eritrócitos foram centrifugados a 1500 rpm (800 g) durante 5 minutos em TA e lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 (pH 7,2) incompleto. Os parasitos foram cultivados sob as condições rotineiras, com RPMI completo RPMI-1640, pH 7,2 e 10% de plasma humano desfibrinado.

### 3.5. Sincronização da cultura

Para obtenção dos estágios de trofozoítos jovens (anéis com até 4 horas após a reinvasão) de *P. falciparum*, os parasitos em cultura foram sincronizados utilizando tratamento com sorbitol (LAMBROS et al., 1979). As suspensões de eritrócitos parasitados com *P. falciparum* em cultivo asincrônico foram centrifugados (1500 rpm ou 800 g) durante 5 minutos e incubados em 5 - 10 volumes (do precipitado de eritrócitos infectados) de sorbitol 5% durante 10 minutos. A solução foi agitada três vezes neste período.

Na sequência foi realizada nova centrifugação e o D-sorbitol foi aspirado e os eritrócitos parasitados foram lavados duas vezes com RPMI – 1640 incompleto, novamente centrifugados. Em seguida os eritrócitos parasitados foram ressuspensos em meio completo e, foram cultivados a 37°C sob condições rotineiras.

### 3.6. Enriquecimento dos trofozoítos

Para o enriquecimento em trofozoítos foi utilizado o método de sedimentação com Plasmagel<sup>®</sup> (Fresenius Kabi). O cultivo contendo parasitos predominantemente no estágio trofozoítos maduro (18-20h), foram centrifugados (1500 rpm ou 800 g), durante 5 minutos, em tubos de 15 ml estéril e o sedimento foi ressuspensionado em 2,4 volumes de Plasmagel<sup>®</sup> e 1,4 volumes de meio completo, (RPMI-1640, pH 7,2 e 10% de plasma humano). A mistura foi incubada em posição vertical durante 1 hora a 37°C (LELIEVRE et al., 2005).

Os estágios de trofozoítos jovens e gametócitos se encontram junto com eritrócitos não infectados no sedimento, enquanto os estágios de trofozoítos maduros se encontram no sobrenadante. Essas formas foram retiradas e transferidas para um novo tubo, lavadas com meio RPMI incompleto duas vezes e em seguida colocadas em cultivo e/ou utilizadas para os experimentos de *panning* utilizando células CHO.

### 3.7. Cultivo de células de ovário de hamster

Neste estudo utilizamos para a realização de ensaios de citoaderência linhagens de células CHO expressando constitutivamente na sua superfície os receptores endoteliais humanos CHO<sub>ICAM-1</sub>, CHO<sub>VCAM</sub>, CHO<sub>CD36</sub>, CHO<sub>CSA-k1</sub>, CHO<sub>E-Selectina</sub>, obtidos por transgênese (tabela 5). Todas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr Artur Scherf, do Instituto Pasteur, em Paris.

As linhagens de células foram cultivadas em garrafas de cultura 75 mL, com meio RPMI-1640 acrescidas de 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As linhagens de células foram replaqueadas a cada três dias, utilizando 0,1% de tripsina-EDTA (Cultilab), descrito em (AUSUBEL et al., 1989).

**Tabela 5:** Perfil das linhagens de células transfectadas.

<b>Linhagens Celulares</b>	<b>Transfecção</b>	<b>Fenótipo</b>
<b>CHO-K1</b>		CSA
<b>CHO<sub>ICAM-1</sub></b>	+ gene ICAM-1	ICAM-1
<b>CHO<sub>CD36</sub></b>	+ gene CD36	CD36
<b>CHO<sub>VCAM</sub></b>	+ gene VCAM	VCAM
<b>CHO<sub>E-Selectina</sub></b>	+ E-Selectina	E-SELECTINA
<b>CHO-745</b>	_____	_____

### **3.8. Citoaderência de linhagens dos isolados naturais de *P. falciparum* selecionados por *panning* em receptores endoteliais expressos nas células *Chinese Hamster Ovary*.**

Os eritrócitos parasitados com *P. falciparum* durante a infecção possuem a capacidade de aderir a receptores endoteliais do hospedeiro. Para avaliar se a expressão do gene *Pfclag9* está associada direta ou indiretamente a adesão do receptor CD36, como descrita anteriormente ou a outros receptores endoteliais, linhagens de parasitos com propriedades específicas de adesão a cada um dos receptores acima enumerados foram selecionados pela técnica do *panning*.

Para o experimento de citoaderência, suspensões de trofozoítos maduros e esquizontes foram enriquecidos pelo método de Plasmagel<sup>®</sup> e os eritrócitos infectados com parasitos foram ressuspensos em meio de cultura especial denominado de *meio binding* (RPMI-1640 pH 6,8 (sem NaHCO<sub>3</sub>) e 10% de plasma humano (O+).

As células da linhagem CHO expressando cada receptor de interesse foram repicadas (replaqueadas) três dias antes do experimento e utilizamos nas placas em condições de confluência entre 90-100%.

As células CHO foram lavadas três vezes com meio RPMI-1640 incompleto (pH 6,8) e duas vezes com meio *binding*. Os eritrócitos parasitados foram adicionados ao contato das células CHO e as garrafas incubadas durante 1 hora a 37°C com agitação delicada a cada 15 minutos de intervalo.

Após a incubação, os eritrócitos não aderidos foram aspirados e as células lavadas 3 vezes com RPMI-1640 incompleto (pH 6,8). Após as lavagens, nenhum eritrócito não aderido foi observado.

Os parasitos aderidos foram retirados das células com meio RPMI-1640 completo alcalino (pH 7,2) e novamente colocados em cultivo sob condições rotineiras. Para evitar contaminação do cultivo de eritrócitos parasitados com células CHO, o cultivo foi transferido um dia após o *panning* para nova garrafa de cultura com 25 cm<sup>2</sup>.

Os parasitos após seleção foram recuperados, utilizando lavagens com meio RPMI 1640 (Invitrogen) completo (pH 7.2) e colocados em cultivo para as repetições do *panning*.

O procedimento de citoaderência foi repetido mais de cinco vezes e sempre antes de cada experimento em que parasitos selecionados em estoque foram utilizados em condições de  $5 \times 10^6$  eritrócitos parasitados mantidos em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup>.

Posteriormente os parasitos foram transferidos para placas de cultura com 24 poços com células CHO com os respectivos receptores de interesse cultivados em lamínulas de vidro 13mm<sup>2</sup>, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/lamínulas e os ensaios foram realizados em triplicatas para posterior contagem.

As células CHO com os respectivos receptores de interesse CHO<sub>CD36</sub>, CHO<sub>CSA</sub> e CHO<sub>ICAM-1</sub> foram analisados para controle da especificidade do receptor utilizando anticorpos específicos. Neste ensaio utilizou-se o separador de células ativadas (FACSscan), os dados foram processados utilizando o software BD Cell Quest™.

### **3.9. Extração de DNA e purificação dos produtos da PCR**

Para análise da sequência do gene *Pfclag9* dos parasitos, foram extraídos os DNAs de cada amostra dos parasitos das linhagens originais utilizadas e de cada linhagem dos isolados pós-*panning*. Para isso, foram utilizados 300µl de sedimento de cada amostra, que foram extraídos com o Kit *GE Healthcare, blood genomic Prep Mini Spin Kit*.

Antes da clonagem, os produtos de amplificação analisadas em gel de TAE agarose 1,5% purificados.

As bandas de interesse foram cortadas de cada gel com lâminas de bisturi estéril e transferidas para tubos de micro centrifuga de 1,5 mL. A purificação foi realizada com o Kit Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA purification System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

Para testar o sucesso da purificação de fragmentos, foi feito um gel de agarose 1,5% com 1,0 µl de cada produto recuperado.

### **3.10. Clonagem de fragmentos do gene *Pfclag9***

Cada fragmento purificado foi ligado em vetor pGEM Teasy<sup>®</sup> (Promega) e transformado em células químio-competentes da linhagem *E. coli*, TOP10 (DH10B). A ligação foi realizada durante uma hora a temperatura ambiente e em seguida mantida a 4°C durante a noite, para aumentar a eficiência das ligações. Foi utilizado 60µl das bactérias competentes foram transformadas através de choque térmico durante 1 minuto a 42°C em banho seco, com 3µl de cada ligação.

Para seleção dos transformantes, as células foram cultivadas em placas de Petri contendo 20 mL de LB Agar, acrescido de 20 µl de ampicilina 50mg/mL, suplementadas com 20 µg/mL de X-gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside*) e 20 mg/mL de IPTG (*isopropyl β-D-thiogalactoside*), e incubadas a 37°C por até 16 horas. As colônias resistentes a ampicilina possuíam o plasmídeo, mas apenas as colônias brancas apresentavam insertos, interrompendo o gene de β-galactosidase do plasmídeo.

No dia seguinte, foram selecionados aleatoriamente, três colônias de cada placa. Estas colônias foram tocadas com palitos de madeira estéreis e transferidas para tubos de 15 mL contendo 1,0 mL de meio LB caldo (triptona 1g, extrato de levedura 0,5g, quantidade suficiente para o volume de 100 mL e 10 µl de ampicilina 100ug/mL) e foram incubados a 37°C, sob agitação durante a noite. No dia seguinte, os plasmídeos foram purificados.



### 3.11. Extração de DNA plasmidial e sequenciamento

A purificação do vetor foi realizada seguindo o método de lise alcalina SDS (SAMBROOK et al., 1989), após o período de incubação, foram centrifugados a 1000g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 300 µl da solução de purificação I (50 mM glicose, 25 mM tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) e transferido para um tubo de 1,5 mL, novamente adicionados 300 µl da solução II (0,2N NaOH, 1% SDS) e as amostras foram mantidas sob suave agitação e mantido a temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida foi adicionado 300µl de solução III (3M de acetato de potássio, 11,5% v/v de Ácido acético glacial), agitado fortemente e mantido no gelo durante 5 minutos.

Cada amostra foi centrifugada a 12000 g durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 ml. Ao sobrenadante foram adicionados 500 µl de isopropanol PA, esta solução foi misturada e deixada em repouso durante 15 minutos a temperatura ambiente. Novamente cada amostra foi centrifugada a 12000g durante 20 minutos, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70%, novamente centrifugado e o etanol descartado, em seguida cada amostra foi deixada aberta a temperatura ambiente para secar e após ressuspensionada em 50 µl de água contendo RNase A 10µg/mL e incubadas durante 30 minutos a 37°C.

A confirmação do isolamento do plasmídeo e da presença do fragmento foi realizada a partir de reações de digestão utilizando a endonuclease de restrição *EcoRI* (5U) seguindo as instruções do fabricante (Promega).

Os clones dos isolados de *P. falciparum* naturais, previamente selecionados após citoaderência foram sequenciados, utilizando *BigDye 3.1 Terminador Cycle Sequencing Kit* Perkin Elmer, MA - USA), conforme instruções do fabricante e contendo 200ng de cada minipreparação de plasmídeo, foi utilizado 5 pmoles de cada iniciador da região do exon 9 do gene *Pfclag9*.

As sequências geradas foram analisadas utilizando o Banco de dados do GenBank utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool Program for Nucleotides* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997). O BLAST emitiu assim porcentagem de identidade de sequências geradas comparando-as com sequencias depositadas no GenBank e/ou no PlasmDB.

Para edição e alinhamento utilizamos os programas do pacote DNASTar (v.4.0) e *ClustalW* ([www.ebi.ac.uk/tools/clustaw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/tools/clustaw2/index.html)) e BioEdit versão 7.05 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA).

As sequências foram traduzidas para aminoácidos através do programa EditSeq do pacote do DNASTar, confirmadas e alinhadas em múltiplas sequências. No alinhamento, foi analisado uma região de aproximadamente 189pb das linhagens selecionadas após *panning* e das cepas de referência de *P. falciparum* 3D7, Dd2 e os isolados dos pacientes mantidas *in vitro*. (Anexos VI e VII)

### 3.12. Controle de *Mycoplasma sp* nos cultivos

Os cultivos de *P. falciparum* e das linhagens de células CHO foram testadas para *Mycoplasma sp*, sendo utilizado 300µl de sobrenadante de cada cultivo que foram centrifugados (10.000 x g. durante 5 minutos, em TA), ressuspendido em 35µl de TE (5mM de Tris pH 8.0 e 1mM de EDTA) e desnaturados durante 5 minutos a 95°C. Um microlitro deste material foi utilizado como amostra na amplificação por PCR. Os iniciadores foram descritos na tabela 4.

A reação constitui-se de 1µl de amostra, 1x de tampão 10x de PCR, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM de dNTPs Mix, 0,2U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,5pmol de cada *primer*. As condições de amplificação foram: 5 minutos, 94°C, 30 segundos/94°C, 30s/55°C, 30s/ 72°C, 30 s) repetidos em 30 ciclos; e uma polimerização final durante 10 minutos a 72°C.

O produto da PCR foi analisado em gel de TAE-agarose 1,5% corado com brometo de etídio, como controle foi utilizado DNA de *Mycoplasma sp.*, cedido gentilmente pelo Departamento de Microbiologia do ICB/USP. O fragmento foi observado entre 300-400pb.

### 3.13. Desenho dos iniciadores

O desenho dos iniciadores da reação para o estudo do gene *Pfclag9*, foram baseados na sequência depositada no Banco de Dados do PlasmDB, disponível sob a identificação (PFI1730w) e foram analisados com o auxílio do software *primer Express oligo design software* da Applied Biosystems) do programa *Sequence Detection System* (SDS) 7500.

No programa IDT (*Integrated DNA Technologies, Inc.*) - *SciTools OligoAnalyzer 3.1*, software *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), as sequências foram alinhadas para que fosse definido o segmento mais adequado para a amplificação.

O conjunto de iniciadores foi analisado com o auxílio do *software OligoAnalyser* ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)), buscando-se quando possível, condições de alta energia ( $\Delta G > 0$ ) para formação de dímeros, heterodímeros e grampos nas reações da PCR (GINZINGER, 2002). Após a escolha dos iniciadores, estes foram sintetizados pela empresa Prodimol (Belo Horizonte)<sup>®</sup> (tabela 6).

Os iniciadores a serem utilizados em PCR em tempo real foram desenhados para hibridar entre os exons 8 e 9 do gene *Pfclag9*. O tamanho do produto da PCR menor que 150 pares de base (Pb), temperatura de hibridação próximo de 60°C, foram consideradas para os iniciadores da PCR em tempo real seguindo recomendações do *User Bulletin 2*, Applied biosystems <http://www.appliedbiosystems.com>, QIAGEN, 2007, 2009, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Em seguida foram selecionados os genes normalizadores como controle interno, neste estudo foram utilizados os seguintes normalizadores: *Seryl tRNA synthetase*, *fructose biphosphatase aldolase* e actina, (SALANTI et al., 2003).

**Tabela 6:** Iniciadores testados nos ensaios de Transcrição Reversa seguida da Reação quantitativa da Polimerase em Cadeia (RTqPCR) do gene *Pfclag9*.

Acesso	Pb	código	Iniciadores 5'→ 3'
<b>PFI1730w</b>		pExon F	gaggtacctttataccaccgaaa
<b>pExon</b>	108	pExon R	acaaggttagggcatttttg
<b>PFI1730w</b>		uExon F	acgaagaagcaatggtatcaagagtt
<b>UExon</b>	100	uExon R	caaatgttgaagagtaatgtca
<b>PF07_0073</b>		<i>Ser</i> F	aagtagcaggtcatcgtggtt
<b><i>Seryl tRNA Synthetase</i></b>	158	<i>Ser</i> R	ttcggcacatttccataa
<b>PF 14_0425</b>		<i>Frut</i> F	tgtaccaccagccttaccag
<b><i>Fructose biphosphate aldolase</i></b>	167	<i>Frut</i> R	ttccttgccatgtgtcaat
<b>PFL2215W</b>		<i>Act</i> F	agcagcaggaatccacaca
<b><i>Actin</i></b>	160	<i>Act</i> R	tgatggtgcaagggttgtaa
<b>18Ssu rRNA</b>		<i>18S</i> F	acgatcagataccgtcgaatctt
	100	<i>18S</i> R	caatctaaaagtcacctcgaaagatg
<b>PFI1730 w</b>		<i>MF</i>	catggtttgtcccttcgtt
<b><i>Mclag</i></b>	240	<i>MR</i>	ccattgcttcttctgaagcac
<b>PFI1730 w</b>	231	<i>NF</i>	tctcacagaagaatgatgatgtg
<b><i>Nclag</i></b>		<i>NR</i>	acgcaacatgtctgctttacc

Abreviações: Pb = pares de base, pExon = penúltimo exon 8, UExon = último exon 9; *Mclag* = região do último exon 9, *Nclag* = região do penúltimo exon 8.

### 3.14. Extração de RNA

O RNA total das amostras foi isolado utilizando Trizol LS<sup>®</sup> (Invitrogen). Os eritrócitos infectados foram lisados com saponina 0,1% em PBS 1x e os parasitos, separados por centrifugação a 1500 g durante 7 minutos. Cada sedimento foi lavado com PBS 1x *RNAse free* gelado e ressuspenso em 100 µl de PBS 1x, homogeneizado e foi adicionado 750 µl de

Trizol LS® e estocamos a -80°C até o momento de ser processado. Este reagente consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina-isocianato, que deriva da melhoria do método de isolamento de RNA desenvolvido por (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987).

Durante a homogeneização de cada amostra, o Trizol LS® mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. A adição do clorofórmio, seguida de centrifugação a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, separa a solução em três fases: inferior/orgânica, interfase e superior/aquosa.

Os ácidos nucleicos permanecem exclusivamente na fase aquosa. Depois da transferência da fase aquosa para o novo tubo, o RNA foi recuperado por precipitação com álcool isopropílico PA (Merck) após centrifugação de 12000 g durante 1h a 4°C. Após lavagem com etanol (Merck) 75% e centrifugação 7500 g por 5 minutos a 4°C, o RNA total foi ressuspenso em água milli-Q autoclavada que preparamos com DEPC 0,01% (Diethyl Policarbonato) e foram armazenados a uma temperatura de -80 °C em alíquotas.

Devido à baixa concentração do RNA obtido, cada amostra foi novamente precipitada com isopropanol, adicionamos três vezes o volume de isopropanol gelado sobre a solução aquosa de RNA, estas foram incubadas a -20°C durante 18 horas e então centrifugadas a 12000 x g durante 1 hora. O precipitado de RNA foi lavado com Etanol 75% e ressuspenso em 15µl de água livre de nuclease.

Para verificar a pureza e concentração do RNA total, uma alíquota de 2µl de cada amostra foi submetida à leitura de absorvância em espectrofotômetro (NanoDrop, ND-1000).

Tendo sido feita a avaliamos a integridade de todos os RNA, uma alíquota de 1µl de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5 x (44 mM Tris, Base, 44 mM ácido Bórico, 1,2 mM EDTA). O gel foi submetido a 75 V por aproximadamente 40 minutos, corado em solução de brometo de etídio 0,5ug/ml e posteriormente visualizado diretamente em transiluminador de luz ultravioleta.

### **3.15. Tratamento com DNase I e síntese do cDNA**

Após a verificação da integridade do RNA , foi realizado esse procedimento, que visa antes do uso na reação da transcriptase reversa, observar a presença de DNA contaminante que foi hidrolisado para evitar falso-positivos em ampliações subsequentes.

O tratamento foi realizado, em 1µg de RNA total, que foi tratado durante três vezes seguidas com enzima DNase I (Invitrogen), durante 15 minutos de incubação a 20°C e inativação de enzima por incubação a 65°C durante 10 minutos e após adição de 2,5 mM final de EDTA, pH 8.0).

Foram realizados ensaios paralelos com a finalidade de avaliar se o tratamento com DNase I não interferiu na síntese de cDNA ou na qualidade dos ensaios da PCR.

A reação de transcrição reversa utilizando 1µg de RNA total foi adicionado 1µl de oligo dT (0,5 µg/µl), 1µl de *Random primers*, 1µl de *dNTP mix* (10mM) e água com quantidade suficiente para o volume para 10µl, sendo incubado a 65°C durante 5 minutos e após, esfriado em gelo durante 1 minuto.

Foi preparada uma mistura contendo 2 µl de *5x First Strand Buffer*, 4µl de  $MgCl_2$  (25mM), 2µl de DTT- ditioneitol (0,1 M), 1µl de inibidor de RNase 40U µl (Invitrogen). Adicionamos 9µl à reação anterior e foram incubados durante 2 minutos a 42°C. Após, foi adicionado e 1µl de transcriptase reversa 200U/µl (*SuperScript II* – Invitrogen) a cada tubo e incubado durante 50 minutos a 42°C e posteriormente inativada a 70°C durante 15 minutos. Finalizando a reação, foi adicionado 1µl de enzima RNase H, durante 20 minutos a 37°C.

Foi utilizado como controle negativo uma alíquota de RT (-) na ausência da transcriptase reversa, de cada amostra, que foram separadas e testadas respectivamente nos ensaios para observar a presença de DNA contaminante.

As reações foram realizadas no termociclador Gene AMP PCR System 9700 (Perkin Elmer). Em seguida, estas amostras foram diluídas 1:2 com água milli-Q autoclavada e armazenadas a - 20°C; para posteriormente preparo da reação Transcrição Reversa seguida da Reação quantitativa da Polimerase em Cadeia (RTqPCR)

### 3.16. RTqPCR

Para realização desta etapa do experimento foi utilizada a plataforma da Applied Biosystems - Real Time PCR SDS 7500 Software e de acordo com o manual do fabricante, (Applied Biosystems, 2005/Sybr® Green I). Os ensaios foram realizadas em placas de 96 poços (*Micro Amp® Optical 96 well Reaction Plate with Barcode*), cobertas com adesivos ópticos. (*Optical Adhesive Covers*) (*Applied Biosystems*).

O método químico utilizado foi o Sybr® Green I Master Mix (*Applied Biosystems*) as reações foram compostas por: Sybr® Green I Master Mix contém o corante intercalante em uma concentração final de 1x, e todos os reagentes necessários da PCR (dNTPs,  $MgCl_2$

Tampão AmpliTaqGold<sup>®</sup>), os iniciadores (0,2 $\mu$ M) descritos na tabela 5, e o cDNA de cada amostra. As reações foram preparadas em triplicatas, utilizando para cada amostra o controle (-RT), com volume final de 15  $\mu$ l em quatro repetições independentes para cada ensaio.

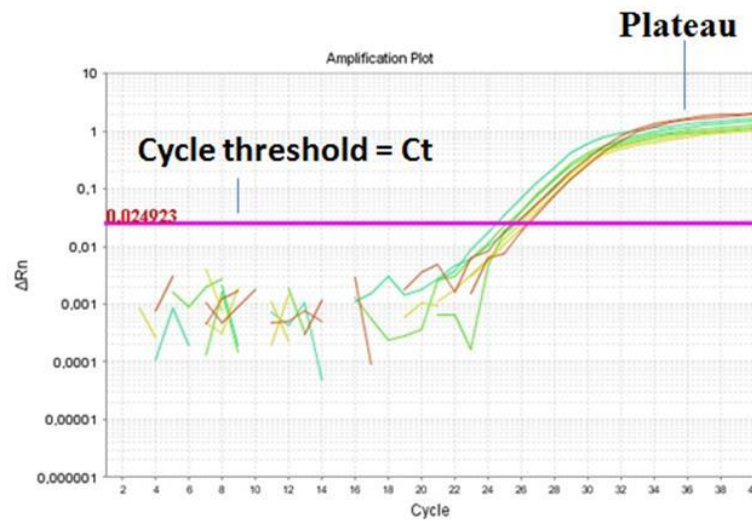
Os ensaios foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C. Ao final da amplificação adiciona-se um passo final (ciclo final) de separação das fitas, com temperatura crescente de 60 a 95°C (2°C/min.). Foi obtida fluorescência do produto da PCR medida a cada 15 segundos e esses dados foram empregados para obtenção da curva de dissociação (*melting curve*) dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação no final da ciclagem de cada ensaio.

As amplificações de produtos inespecíficos foram excluídas pela análise da curva de dissociação dos produtos da PCR. A curva de dissociação foi mostrada em um gráfico com os dados de dissociação do produto da PCR. Alterações na fluorescência são plotados em relação a temperatura (60°C a 90°C) sendo que estas mudanças são devido à interação do corante SYBR com a dupla fita de DNA (<http://www.gene-quantification.info/> acesso em 26/08/2008, QIAGEN, 2009).

A especificidade de todos os oligonucleotídeos foi confirmada através das curvas geradas de dissociação após o ensaio da PCR em tempo real (figura 10). A curva de desnaturação depende das características da sequência de DNA, do tamanho do fragmento e do conteúdo de GC no desenho. A confirmação da especificidade dos oligonucleotídeos foi comprovada através do gel de agarose.

O sistema informa se está ocorrendo amplificação da molécula alvo e quantifica esta amplificação, uma vez que o *software da Applied Biosystems* correlaciona a intensidade do sinal emitido com a quantidade do produto amplificado formado. Nestas condições o procedimento utilizado para estimar a quantidade relativa das concentrações de RNA mensageiro do gene, comparando com a expressão do gene constitutivo (controle interno), foi baseada na detecção em tempo real do produto da PCR gerado, utilizando o corante Sybr<sup>®</sup> Green I (*USER BULLETIN 2*, Applied Biosystems).

A quantificação de DNAs alvo ocorre pela determinação do ciclo limiar, (Ct) ou CQ (ciclo de quantificação). O Ct é definido como o ciclo da reação da PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha basal arbitrária chamada limiar.



**Figura 10:** Transcrição Reversa RTqPCR em tempo real com 40 ciclos, delimitação e determinação do Ct, plataforma da *Applied Biosystems*

Os valores são apresentados na forma de Ct, o limiar está delimitado na fase exponencial de amplificação, acima do ruído e a baixa da fase de platô da reação. O valor do Ct é inversamente proporcional a quantidade inicial neste caso o cDNA do transcrito, presente no teste.

Os testes pilotos foram realizados para a determinação das concentrações ótimas de cada iniciador e selecionamos as concentrações de iniciadores onde ocorria amplificação sem formação de dímeros ou produtos inespecíficos.

Para isso utilizamos a mesma concentração da amostra e concentrações diferentes dos pares de iniciadores (sense e antisense), As concentrações testadas foram 100, 200, 300, 400, 500 mM de cada par de iniciadores.

Considerando que utilizamos a mesma quantidade de amostra em todas as reações, o Ct não deveria variar. Se o aumento da concentração de iniciadores ocasionou diminuição de Ct, então a quantidade deste reagente na reação ainda era insuficiente. Assim, a concentração selecionada foi à mínima, associada ao menor Ct.

Entre os métodos descritos para analisar os resultados de cada ensaio podemos utilizar na PCR em tempo real: a quantificação absoluta e a quantificação relativa. Na absoluta determina o número exato de cópias do transcrito de interesse e na relativa é possível



descrever a alteração na expressão em relação a algum grupo, como controle não tratado e no tempo zero (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

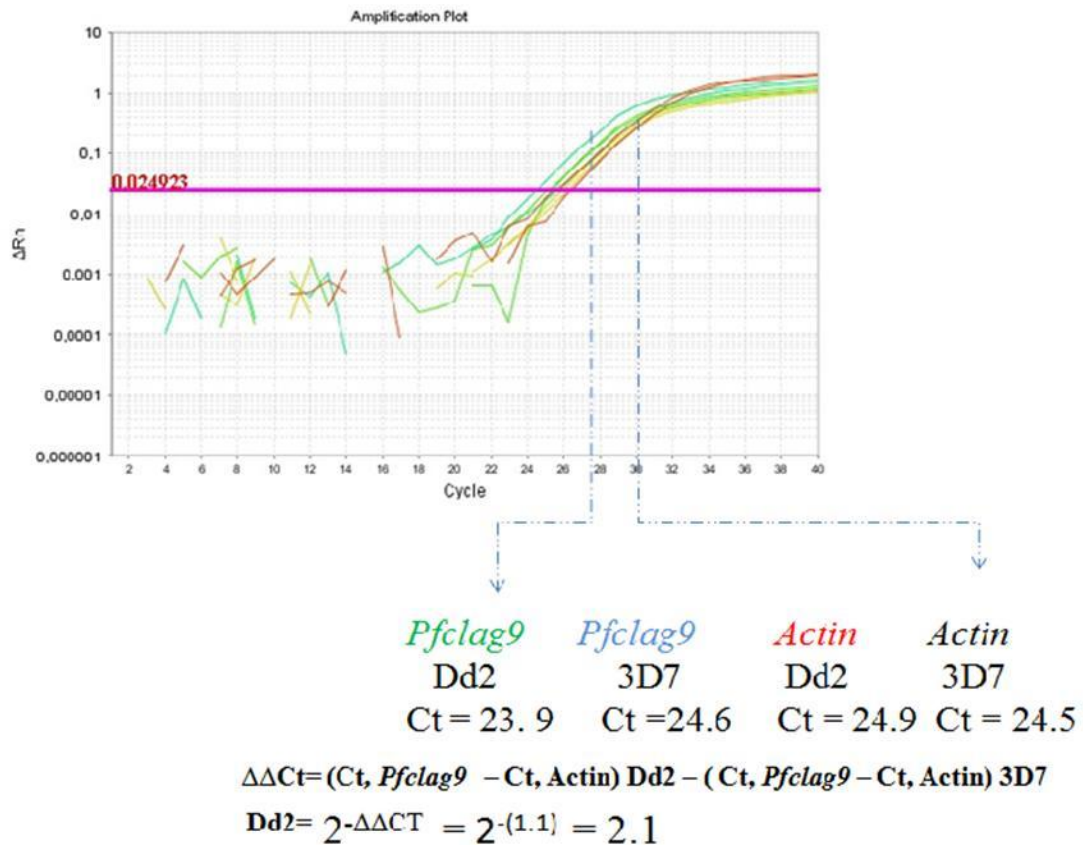
### 3.17. Método $2^{-\Delta\Delta CT}$

Entre os métodos para quantificação relativa de expressão gênica escolhemos o método delta, delta Ct, descrito como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), que permitiu quantificar as diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as várias amostras analisadas.

Inicialmente foi calculado o delta Ct ( $\Delta Ct$ ) de cada amostra, subtraindo-se os valores de Ct (ciclo de *threshold* ou Cq ciclo quantitativo) do gene normalizador (actina - (ACT), *Seryl tRNA synthetase* - (SER), e *fructose biphosphatase aldolase* - (FRUT) dos valores de Ct do gene alvo (*Pfclag9*). Após determinação do delta Ct de cada amostra, escolhemos uma amostra normalizadora o cDNA das cepas 3D7, Dd2 e dos pacientes P3, P5 e P59 cultivados na ausência de *panning*.

Para o cálculo do delta, delta Ct, foi utilizado a seguinte fórmula: [delta Ct (amostra) - delta Ct (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o delta, delta Ct, aplicamos a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que resultou no valor da expressão gênica relativa a cada amostra testa frente cada gene normalizador testado (figura 11).

Os dados gerados da análise quantitativa relativa são dados pelo valor de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores gerados podem ser interpretados como a expressão do gene alvo relativo ao controle interno na amostra tratada comparada ao calibrador (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).



**Figura 11:** Quantificação do gene *Pfclag9* em Dd2 relativo 3D7, número de cópias estimado utilizando o método delta, delta Ct,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , com 40 ciclos, delimitação e determinação do Ct, plataforma da *Applied Biosystems*.

Para determinar se as reações de amplificação apresentaram a mesma eficiência, foi observada como o  $\Delta Ct$  (Ct alvo – Ct controle normalizador) variou com a diluição de cada controle. Estes valores são representados em gráfico de regressão linear.

Um valor igual a -3.32 demonstra uma eficiência de 100% de duplicação a cada ciclo, naquela fluorescência, em relação a linearidade (R2) de 1,0 demonstrou que o ensaio se mantém com eficiência similares em diferentes concentrações de amostras de cDNA avaliado.

Após estabelecer as curvas padrões foi estabelecido o *threshold* de cada par de iniciadores, que foram previamente estabelecidos na menor fluorescência em que a reação ocorre com uma eficiência de duplicação de 100%. Em seguida foi estabelecido o ciclo de *threshold* de cada amostra, que é a variável utilizada na quantificação relativa.

Foram utilizados controles negativos para todos os ensaios gerado (-RT), água e mix da reação que continham os iniciadores, na ausência de cDNAs.

### 3.18. Metodologias dos estudos imunológicos

#### 3.18.1. Peptídeos PfCLAG9

Os peptídeos foram definidos a partir das análises bioinformáticas da sequência identificada (PlasmoDB PFI1730w/ NCBI GI:167963009) da cepa 3D7 e sintetizados pela empresa (*GenScript peptide*), Peptídeo A (Lote: 664310010423), Peptídeo B (Lote: 664310020423) e Peptídeo C (Lote: 664310030503).

O mapeamento dos peptídeos foi definido utilizando alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos correspondentes a proteína PfCLAG9, utilizamos o programa *Protean-DNAStar* para mapear peptídeos que apresentassem 03 perfis inicialmente determinados.

A seleção das sequências de aminoácidos da proteína PfCLAG9 foram construídas utilizando-se combinação de análise através de cinco métodos: *Surface Accessibility Prediction* (EMINI et al., 1985) *Flexibility Prediction* (KARPLUS et al., 1985); *Hydrophilicity Prediction* (PARKER et al., 1986), *Antigenic Propensity* (KOLASKAR et al., 1990); *Linear Epitope Prediction* (LARSEN et al., 2006). Para variação dos cálculos foi utilizado o software: *Antibody Epitope Prediction available at the Immune Epitope Database (IEDB) website* ([http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)).

Após as análises selecionamos três peptídeos denominados A, B e C, que foram utilizados nesta etapa do estudo. As análises de similaridade e conservação entre os peptídeos PfCLAG9 e as regiões das proteínas de *P. vivax*, PvCLAG7 (Genbank Id: 156081674) e PvCLAG8 (Genbank Id: 156096581) foi realizada através do software ClustalW (THOMPSON et al., 1994).

### 3.18.2. Ensaios imunoenzimáticos - (*Enzyme-linked immuno Sorbent Assay* - ELISA)

A reatividade dos soros de pacientes portadores de malária clínica ou de portadores assintomáticos de parasitos de malária contra cada peptídeo da proteína PfCLAG 9, foram analisadas utilizando ensaios imunoenzimáticos, os controles negativos da área endêmica e da área não endêmica que selecionamos e foram testados em duplicatas em três ensaios independentes.

Os ensaios foram preparados em placas (NUNC, Maxi Sorp™ Thermo Fisher Scientific), que foram sensibilizadas com 1µg/ mL de cada peptídeo A, B e C, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9.6, a 4°C durante 18 horas. (BRAGA et al., 2002). Posteriormente, após incubação durante a noite, as placas foram lavadas 4x com solução salina tamponada fosfatada tampão de fosfato, pH 7.2 (STP), (PBS contendo 0,05% de Tween 20, (Sigma) – (PBS Tw), Sigma, Chemical Company, St Louis. USA).

Os poços foram então incubados com 150µl de leite em pó desnatado 5% diluídos em PBS Tw e incubados durante 2 horas a 37°C em câmara úmida. Seguindo-se de cinco lavagens com (PBS Tw), posteriormente incubadas com 100µl de cada soro diluídos 1: 1000 em (leite desnatado 2% em PBS Tw) distribuídos em duplicatas e incubados durante 1h a 37°C.

As placas foram lavadas 4x (PBS Tw) e incubadas nas seguintes condições com 100µl/orifício com anti-IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma) diluída 1:8000 em (PBS Tw 0,05% e leite desnatado 2%); em seguida as placas foram novamente lavadas quatro vezes (PBS Tw).

Após todas estas etapas explicitadas foram adicionados 100 µl/poço do substrato TMB, (10mg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% tampão citrato/fosfato - Sigma). A reação foi interrompida com 50µl/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N (Merck). A densidade óptica foi medida a 450/540nm, utilizando leitor de ELISA automático (Software Gen5). Após a padronização do ELISA, foram avaliadas as amostras de soro controles e de cada localidade independente.

Os resultados foram expressos como índice de reatividade (IR), sendo o IR = densidade óptica (D.O.), da amostra/ D.O. do ponto de corte (*cut-off*). O *cut-off* foi calculado utilizando a média das D.O.s de 64 amostras de soro de doadores controle (negativos) mais

duas vezes o desvio padrão (SD). Os valores de *cut-off* para o Peptídeo A (0,216), Peptídeo B (0,226) e Peptídeo C (0,236).

O resultado final de cada amostra em duplicata foi analisado em índice de reatividade (IR), o qual foi obtido, dividindo-se a absorbância de cada soro testado pelo ponto de corte. Considerou-se positivo o soro com  $IR \geq 1$ .

### **3.19. ELISA anti-PfMSP1-19 e anti-PvMSP1-19 (Proteínas de Superfície de Merozoítos de *P. falciparum* e *P. vivax*).**

O controle da viabilidade, da especificidade e da reatividade dos soros utilizados no estudo foi avaliado utilizando-se a técnica ELISA conforme anteriormente explicitado, porém, com algumas modificações.

As proteínas PvMSP1-19 e PfMSP1-19, densidade óptica (OD) 450/540nm, envolve o fragmento de 19kDa e que representa a porção C-terminal conservado entre as espécies da proteína 1 de superfície de merozoíto de *P. falciparum* (PfMSP1-19) e proteína de superfície de merozoíto de *P. vivax* (PvMSP1-19) fusionadas com Glutathione S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum*, foram cedidas e sequenciadas gentilmente pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II) da Universidade de São Paulo - (USP).

A porção C-terminal da MSP1-19 (Bloco ICB10) *P. vivax* sem região de ancoragem GPI, é um dos alvos para a resposta imune contra o parasito, quando os indivíduos são expostos naturalmente à malária. (AKPOCHENETA et al., 2008; FERREIRA et al., 1998, 2000; WILSON et al., 2011).

Essa região da proteína foi utilizada para determinação da absorbância de cada amostra, calculamos a média das densidades ópticas dos anticorpos anti-PfMSP1-19, subtraindo-se dela a média das ODs obtidas para o GST.

### **3.20. Determinação do limiar e do Índice de Reatividade (IR)**

Para determinar o ponto corte (*cut-off* de reatividade), foram utilizados soros negativos de 32 indivíduos sem contato prévio com malária e/ou histórico de exposição à malária, do Banco de sangue da região de S. Joaquim da Barra, no interior de São Paulo.

O ponto de corte foi definido como a média da absorbância dos soros negativos acrescido de dois desvios padrão para PfMSP1-19 (0,284) e PvMSP1-19 (0,273).

O Índice de Reatividade (IR) de cada amostra foi obtido dividindo-se a absorbância do respectivo soro pelo valor do ponto corte, sendo considerado positivo o soro com  $IR \geq 1$ .

### **3.21. Imunização dos camundongos com peptídeos sintéticos de PfCLAG9**

Neste estudo foi utilizado um total de 20 camundongos, da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade de até um mês aproximadamente, pesando entre 18 a 22 g, fornecido pelo Biotério, localizado no Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais – IPEPATRO, Porto Velho - Rondônia.

Os animais foram agrupados em quatro grupos denominados de (GI, II, III e controle negativo), contendo cada grupo 05 animais, que foram mantidos em gaiolas coletivas, em grupos de no máximo cinco animais, com água e ração *ad libitum* em condições controladas de meio ambiente (luz e temperatura).

Os experimentos foram realizados sob as normas éticas para pesquisa científica com animais de laboratório, conforme o Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEPATRO, lei 6.638 de 8 de maio de 1979, definidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os camundongos BALB/c foram imunizados via coxim-plantar (50µg/animal-50µl/pata) com peptídeos, emulsificados em igual volume de adjuvante completo de Freund (ACF).

Após quinze dias, os animais receberam pela mesma via um segundo reforço com o com adjuvante incompleto (AIF). No grupo controle negativo foi aplicado apenas adjuvante de Freund (ACF e AIF).

A primeira coleta foi realizada após 15 dias de cada grupo, conforme as condições dos animais acompanhados pelo veterinário responsável Cesariano Júnior L. Aprígio - CRMV/RO-503 (LACEN/Vigilância Sanitária) e Dionatan Tatieri Braum - CRMV/RO-909 (CEPEM/SESAU).

### 3.22. Imunofluorescência Indireta (IFI)

Amostras de eritrócitos contendo estágios maduros e esquizontes dos parasitos da cepa de referência 3D7 de *P. falciparum* foram sincronizados e coletados em meio RPMI e/ou PBS 1x com pH 7,2 frio. Os eritrócitos foram lavados duas vezes por centrifugação a 2500 g durante 5 minutos.

Um volume de 10µl do concentrado de eritrócitos foram ressuspensos em PBS 1x e foram distribuídos em cada poço das lâminas de imuno fluorescência, após a secagem a temperatura ambiente (TA) foram criopreservadas -70°C.

Amostras de *P. vivax* foram coletadas 20 mL de sangue total de pacientes, em seguida os parasitos foram previamente selecionados utilizando gradiente de Percoll (Ge Healthcare) (ANDRYSIAK et al., 1986). Após as lavagens com PBS 1x (pH 7,2) durante três vezes, e centrifugados 2500 g durante 4 minutos, em seguida as lâminas foram preparadas como descrito acima.

As lâminas foram descongeladas a 37°C e incubadas com paraformaldeído durante 2 minutos, lavadas cinco vezes com PBS 1x pH.7.2. O bloqueio foi realizado com 0,5% de gelatina, 1,5% de BSA e 0,02% Tween 20 em PBS 1x.

Foram incubadas a 37°C, durante 1 hora, lavadas como descrito acima e incubadas com o anticorpo primário (anti-mouse peptídeos A, B e C e controles negativo), diluído 1:40 em tampão de bloqueio, em seguida foram lavados e incubadas com o anticorpo secundário (Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (1:600), (Life Technologies), foram incubados durante 45 minutos e lavados, em seguida utilizamos 0,2mg/mL 4,6-diamidino-2-phenylidole (DAPI - Sigma). Por fim, as lâminas foram montadas e examinadas usando microscópio (Nikon eclipse 80i).

### 3.23. Análise dos dados

Os métodos estatísticos foram escolhidos de acordo com a natureza dos dados obtidos; os procedimentos estatísticos foram realizados numa etapa preliminar da variável relacionada à normalidade e igualdade de variância entre os grupos. Para os dados paramétricos foram

avaliados por análise de variância, seguida do *Tukey's Multiple Comparison Test*, *Student's t test*, One-Way ANOVA.

O teste não paramétrico de Mann-Witney foi utilizado para comparar a distribuição das D.Os., entre as amostras avaliadas no estudo. As análises foram realizadas utilizando-se o programa Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software – San Diego, USA). Os dados foram expressos como média  $\pm$ SD. As diferenças são consideradas significativas com valor de  $p \leq 0,05$ .

### **3.24. Consentimento ético**

O procedimento para obtenção das amostras biológicas utilizadas neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEP-CEPEM.

Número de Aprovação - CONEP Reg. 14324/Processo n° 25000.167024/2007-53, (Porto Velho) CEPEM e 70/2008 (Trechos: Santo Antônio – Teotônio, Cachoeira do Teotônio - Santo Antônio), (Anexo III, IV).

Todos os procedimentos com os Balb/c foram avaliados e aprovados pelo CEUA IPEPATRO sob o número (2009/2), (Anexo V).





#### 4.1. Caracterização das amostras biológicas dos pacientes e localidades

Durante o desenvolvimento deste estudo foram analisadas amostras de pacientes com infecção por *Plasmodium sp.*, os quais estavam sintomáticos e procuravam atendimento no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), pertencentes à população de Porto Velho, moradores das localidades ribeirinhas (assintomáticos) e amostras controles negativos de pacientes doadores do banco de sangue. As amostras utilizadas estão resumidamente detalhadas conforme a espécie e o número amostral descrito na (tabela 7).

Os soros de todos os quatro grupos amostrais foram utilizadas para o estudo de reconhecimento dos peptídeos PfCLAG9 sintetizados. Das amostras coletadas no CEPEM sintomáticos com *P. vivax* e as com *P. falciparum*, foram isoladas em cultura *in vitro* (n=5), as amostras dos pacientes P1, P2, P3, P5 e P59, (tabela 8). Devido ao crescimento satisfatório durante os ensaios de citoaderência, foram selecionados os isolados dos pacientes P3, P5 e P59 para monitorar a transcrição do gene *Pfclag9*.

**Tabela 7:** Distribuição das amostras biológicas de acordo com os locais

Amostras/ Pacientes	FHEMERON	<sup>a</sup> CEPEM	<sup>b</sup> Localidades Ribeirinhas	S.P. (doadores)	n
<b>Controles</b>	32	-	-	32	64
<b><i>P. falciparum</i></b>	-	47	68	-	115
<b><i>P. vivax</i></b>	-	76	63	-	139
<b>Total</b>	32	123	131	32	318

Abreviações: <sup>a</sup>CEPEM = Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – (pacientes Sintomáticos), <sup>b</sup>Localidades das coletas = Trechos, Vila Candelária, Teotônio (pacientes Assintomáticos), banco sangue da Santa Casa de Misericórdia de São Joaquim da Barra - SP., FHEMERON = Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Rondônia.

As principais características dos pacientes das quais foram obtidos os isolados naturais de *P. falciparum*, foram resumidas na tabela 8, assim como as denominações reservadas aos isolados.

**Tabela 8:** Isolados naturais de *P. falciparum*, dados clínicos e, epidemiológicos dos pacientes oriundos de diferentes localidades do município de Porto Velho - Rondônia.

Isolados naturais de <i>P. falciparum</i>	Pacientes		Episódios anteriores	Dias com sintomas	Parasitemia inicial	Último episódio
	Localidades	Sexo				
P01PVH	B. Socialista	f	04	05	≥3%	01 mês
P02PVH	Linha 45	f	03	05	≥3%	04 meses
<b>P03PVH*</b>	Jacy Paraná	m	02	09	≥2%	18 anos
<b>P05PVH*</b>	Linha 17	m	NS	04	≥3%	04 meses
<b>P59PVH*</b>	Abunã	f	01	10	≥4%	00

Abreviações: PVH = Porto Velho - Rondônia, B = Bairro Socialista, f = feminino, m = masculino, \* três isolados que foram selecionados para análise expressão gene *Pfclag9* antes e após *panning*.

#### 4.2. Avaliação da possível participação indireta do produto do gene *Pfclag9* na citoaderência dos eritrócitos parasitados.

Para avaliar se há alguma correção entre genes *var* e genes *clag9*, indicando alguma participação na citoaderência de CLAG9, mediram os níveis de transcrição de *Pfclag9* em isolados/linhagens de parasitos selecionados para citoaderência diferencial.

Isso foi feito aplicando inicialmente cinco ciclos de *panning* em cada linhagem CHO<sub>CSA-K1</sub>, CHO<sub>CD36</sub> e CHO<sub>ICAM-1</sub>. Cultivadas em lamínulas de vidro de 13mm<sup>2</sup>, em placas de 24 cavidades, na concentração de 5x 10<sup>4</sup> células/lamínulas, utilizando inicialmente os isolados P1, P2, P3, P5 e P59. (tabela 9)

Todos os ensaios foram realizados com uma quantidade equivalente de eritrócitos infectados com parasitemia inicial entre (5-8%). Mostramos na tabela 9 que os cinco isolados naturais apresentaram perfis diferentes. Observamos uma tendência em todas as linhagens dos isolados a citoaderência a um receptor preferencial dominante.

Para selecionar as linhagens de cada isolado específico, avaliamos a intensidade de citoaderência. A primeira observação foi realizada após três ensaios de *panning* em triplicatas com os receptores CHO<sub>CD36</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub>, CHO<sub>VCAM</sub>, CHO<sub>E-selectina</sub> e CHO<sub>CSA-K1</sub>, e os valores observados foram expressos pelo número médio de eritrócitos infectados aderindo a 1000 células.

Após os ciclos de citoaderência para cada receptor independente, os parasitos foram recuperados e coletados. Neste ponto, eles apresentaram um fenótipo bastante homogêneo, aderente às células expressando os respectivos receptores de interesse CHO<sub>CSA</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub> e CHO<sub>CD36</sub>.

**Tabela 9:** Teste de citoaderência dos isolados de *P. falciparum* após três ciclos de *panning*, expresso pelo número médio de parasitos aderido a partir de três experimentos, em triplicatas em lamínulas de 13 mm, independentes.

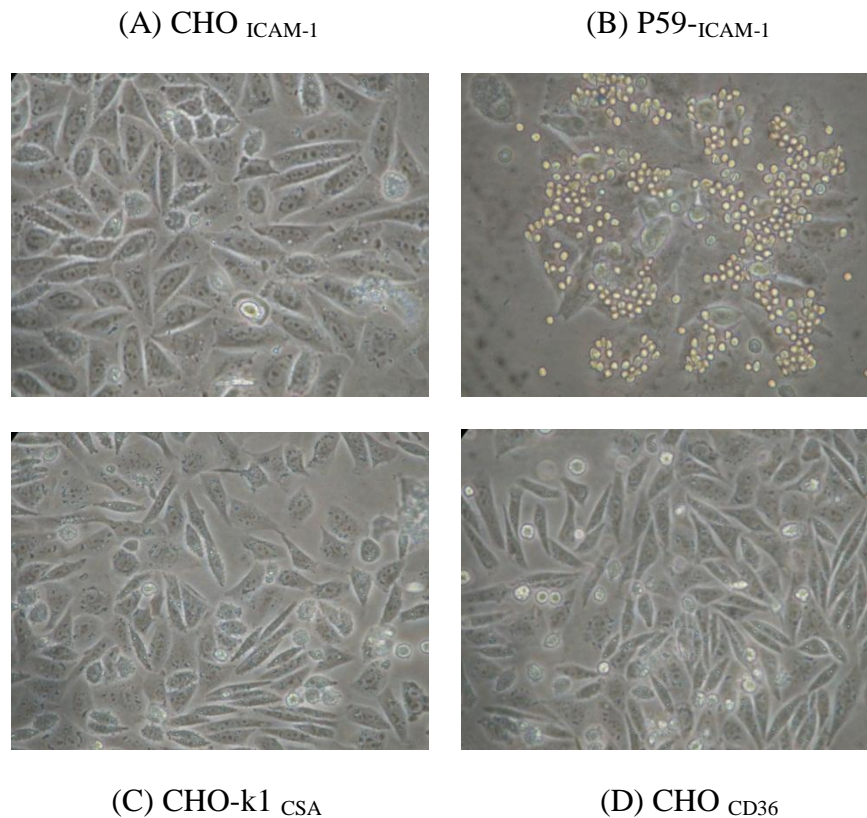
Isolados	P. I.	CHO	CHO	CHO	CHO	CHO
		CD36	CSA-k1	VCAM	ICAM-1	E-Selectina
<b>P01</b>	8%	22 (±0.3)	13 (±0.4)	02 (±0.2)	18 (±0.5)	02 (±0.5)
<b>P02</b>	6%	28 (±0.4)	03 (±0.5)	03 (±0.5)	16 (±0.5)	02 (±0.5)
<b>P03</b>	8%	48 (±0.3)	09 (±0.3)	02 (±0.1)	00	00
<b>P05</b>	5%	06 (±0.2)	43 (±0.4)	03 (±0.1)	08 (±0.2)	00
<b>P59</b>	7%	02 (±0.1)	02 (±0.1)	00	40 (±0.3)	03 (±0.1)
<b>Dd2</b>	5%	19 (±0.2)	22 (±0.3)	05 (±0.2)	18 (±0.4)	05 (±0.2)
<b>3D7</b>	8%	15 (±0.2)	21 (±0.3)	06 (±0.1)	20 (±0.5)	08 (±0.4)

Abreviações: P.I. = parasitemia inicial, linhagens de células *Chinese Hamster Ovary* em 100 células, (desvio padrão).

Mostramos na tabela 9, que após três ciclos de *panning*, em um único receptor, os isolados continuam a apresentar um fenótipo polimórfico de citoaderência, aderindo a outros receptores, além daquele, o qual foi realizado o *panning*. A linhagem do isolado do paciente P01 CHO<sub>CD36</sub>, por exemplo, após três ciclos em CHO<sub>CD36</sub>, continua a aderir no receptor CHO<sub>ICAM-1</sub> e a linhagem do isolado do paciente P02 CHO<sub>ICAM-1</sub>, após *panning*, continua citoaderindo ao receptor CHO<sub>CD36</sub>.

### 4.3. Preparação das linhagens dos isolados naturais de *P. falciparum* com especificidade de citoaderência.

Para preparação das linhagens dos isolados naturais de pacientes com *P. falciparum* com especificidade de citoaderência foram realizados inicialmente ensaios com os isolados identificados como P3, P5 e P59 selecionados para os ensaios de *panning* (figura 12).



**Figura 12:** (A) Células CHO<sub>ICAM-1</sub> antes e (B) após *panning* P59 CHO<sub>ICAM-1</sub>, (C) CHO<sub>k1CSA</sub>, (D) P59 CHO<sub>CD36</sub>. Imagem com aumento de 40x em microscópio invertido.

Entre os isolados previamente selecionados que apresentaram perfil mono aderente foi obtido dos isolados dos pacientes P3, P5 e P59. Dessa forma, decidimos selecionar essas linhagens dos isolados e completar com até oito ciclos de *panning*. (tabela 10).

**Tabela 10:** Ensaios de citoaderência e seleção das linhagens de parasitos selecionados. O resultado positivo (+) é confirmado com a presença de em média no mínimo cinco eritrócitos infectados por célula da linhagem CHO. O resultado negativo (-) quando a contagem de eritrócitos infectados é de  $\pm$  em média 0,1 por cada célula da linhagem CHO.

<b>Linhagens selecionadas</b>	<b>CHO ICAM-1</b>	<b>CHO CSA-k1</b>	<b>CHO CD36</b>	<b>DP</b>	
<b>P59</b>	CSAK1	-	+	-	( $\pm 0.3$ )
	CD36	-	-	+	( $\pm 0.2$ )
	ICAM-1	+	-	-	( $\pm 0.3$ )
<b>P3</b>	CSAK1	-	+	-	( $\pm 0.5$ )
	CD36	-	-	+	( $\pm 0.4$ )
	ICAM-1	+	-	-	( $\pm 0.3$ )
<b>P5</b>	CSAK1	-	+	-	( $\pm 0.2$ )
	CD36	-	-	+	( $\pm 0.3$ )
	ICAM-1	+	-	-	( $\pm 0.1$ )
<b>3D7</b>	CSAK1	-	+	-	( $\pm 0.4$ )
	CD36	-	-	+	( $\pm 0.3$ )
	ICAM-1	+	-	-	( $\pm 0.3$ )

Abreviações: DP = desvio padrão

As nove linhagens dos isolados, obtidas a partir dos isolados naturais dos pacientes P59, P3 e P5, se mostraram mais estáveis e menos heterogêneos em relação aos ensaios de citoaderência e foram selecionados para os experimentos seguintes. As linhagens dos isolados de CHO<sub>E-selectina</sub> e CHO<sub>VCAM</sub>, foram utilizados apenas para sequenciamento e não foram avaliados para análise de expressão do gene *Pfclag9*.

Das diferentes populações de linhagens dos parasitos específicas dos isolados P3, P5, P59 selecionados foram avaliados o polimorfismo e a expressão do gene *Pfclag9*.

#### 4.4. Análises das sequências do gene *Pfclag9* em diferentes isolados diretamente de pacientes e linhagens selecionadas desses.

Para investigar um eventual polimorfismo estrutural do gene *Pfclag9*, os parasitos de diferentes isolados dos pacientes e as linhagens derivadas dos isolados, foram sequenciados clones dos três isolados dos pacientes P59, P3 e P5 antes e após *panning* nos receptores CHO CD36, CHO ICAM-1, CHO VCAM, CHO E-selectina e CHO CSA-K1.

A figura 13 corresponde as sequências obtidas do exon 9. A identificação é dada para cada clone sequenciado pelo número do isolado seguida da indicação do receptor específico da eventual linhagem de cada isolado. Em cada análise adicionou-se a referência da sequência registrada do gene *Pfclag9* (PFI1730W) cepa 3D7 sequenciada e publicada (PlasmoDB).

A

```
SeqP3CSA      LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3VCAM    LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3CD36    LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3        LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3ICAM1   LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3ESEL    LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
PFI1730w     YFENVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
: .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

B

```
SeqP5ESEL    LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP5VCAM   LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP5CSA    LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP5ICAM1  LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP5CD36   LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP5        LILSVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqPFI1730w YFENVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
: .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

C

```
SeqP59E-SEL LILNVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59VCAM  LILNVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59ICAM1 LILNVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59CSA   LILNVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59CD36  LILNVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59      LILNVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
PFI1730w    YFENVIFFLRLNSIRIFDRFYSEILENYVCMYIKRLEFNKLTVDKLLKAMS RAYTSTKKEGAYEEA 63
: .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

**Figura 13:** Alinhamento das sequências obtidas dos aminoácidos do exon 9 do gene *Pfclag9*. As sequências foram comparadas, (A) alinhamento do isolado do paciente P3, (B) alinhamento do isolado do paciente P5 e em (C) isolado do paciente P59. Em todos os casos são apresentados às sequências antes (Seq. P59, P3 e P5) e após *panning* nos receptores identificados como CHO<sub>CD36</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub>, CHO<sub>VCAM</sub>, CHO<sub>E-selectina</sub> e CHO<sub>CSA-K1</sub>, identificadas como (CD36, ICAM1, VCAM, ESEL e CSA). O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando CLUSTALW (versão 2.6), os símbolos nos alinhamentos indicam. \* similaridade forte, (:) similaridade fraca, (.) diferença quando comparado com a sequência PFI1730w publicada da cepa 3D7 de *P. falciparum*.

As análises comparativas mostram uma conservação das sequências com uma pequena exceção de mutação silenciosa (A-G) em dois clones correspondendo as linhagens dos isolados P3<sub>ICAM-1</sub> e P3<sub>E-selectina</sub>. Os resultados do sequenciamento dos três clones dos isolados dos pacientes (P1, P2, P3, P59, 3D7, Dd2) são apresentados em (anexo VI e anexo VII). Todos os clones foram realizados a partir de três ligações. Os isolados dos pacientes mostraram uma conservação das sequências de nucleotídeos e aminoácidos igual a cepa 3D7 na região analisada do exon 9 do gene *Pfclag9*.

#### 4.4.1. Análises das sequências do gene *Pfclag9* de isolados naturais P54, P57, P65 e das cepas de referência controle Dd2 e 3D7.

Todos os isolados naturais dos pacientes P57, P65, P54 e as cepas 3D7 e Dd2 (figura 14) apresentaram o mesmo perfil de sequencia idêntica observado nesta região da cepa de referência 3D7.

```
Seq Dd2      LILNVIFFLRNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRLENKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P57         LILNVIFFLRNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRLENKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P65         LILNVIFFLRNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRLENKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P54         LILNVIFFLRNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRLENKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
PFI1730w    YFENVIFFLRNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRLENKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
3D7         YFENVIFFLRNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRLENKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P65B       YFENVIFFLRNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRLENKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
:          :.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

**Figura 14:** Alinhamento das sequências em aminoácidos obtidas do último exon do gene *Pfclag9*. As sequências foram obtidas dos isolados naturais dos pacientes P54, P57, P65 e foram comparados com as cepas 3D7 e Dd2 mantidas *in vitro*. O sequenciamento foi realizado de três isolados naturais escolhidos ao acaso de pacientes selecionados. O alinhamento foi realizado através do Clustal W (versão 2.6). Os resultados dos isolados naturais avaliados correspondem a 63 aminoácidos e as figuras indicam (\*) similaridade forte, (:) similaridade fraca, (.) diferenças, quando comparadas com a sequência do gene *Pfclag9* PFI1730 w publicada (PlasmoDB).

Em resumo, a comparação das sequências mostrou uma grande conservação do fragmento do gene *Pfclag9* analisado, ressaltando que olhamos apenas para um pequeno pedaço do gene não analisamos outras regiões da sequência.

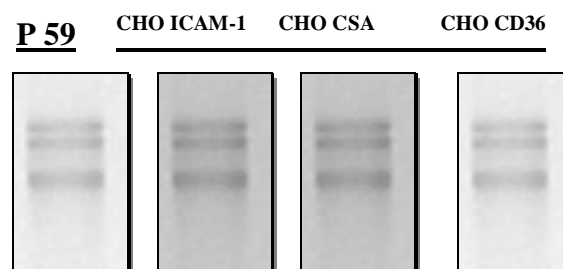
#### 4.5. Análise da transcrição de gene *Pfclag9* por RT-PCR em tempo real

Considerando os resultados anteriores da estabilidade das propriedades de citoaderência dos isolados naturais e das linhagens isoladas dos pacientes preparados por *panning* e da conservação das sequências observadas entre estes, foi utilizada a ferramenta da PCR em tempo real, para avaliar se o gene *Pfclag9* é transcrito de forma diferencial, durante o crescimento dos isolados naturais dos pacientes P59, P3, P5 e as cepas 3D7 e Dd2, foi



observado de algumas de suas linhagens selecionadas para os receptores CHO<sub>CD36</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub>, CHO<sub>CSA-K1</sub>.

Avaliamos a qualidade dos RNAs extraídos e a visualização de duas bandas no gel (figura 15), que correspondem à subunidade maior (28S) e menor (18S) do RNA ribossomal, comprova a integridade do material isolado. A qualidade da extração de RNA é extremamente importante, sendo esta etapa crítica para os passos subsequentes, principalmente nas reações da PCR em tempo real.

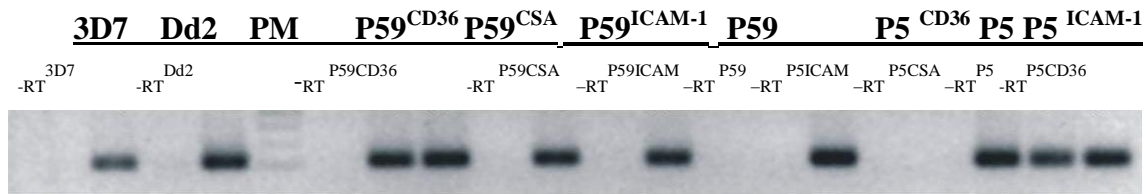


**Figura 15:** Avaliação da qualidade dos RNAs em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando as amostras do isolado do paciente P59 e os suas linhagens preparadas P59CHO<sub>ICAM-1</sub>, CHO<sub>CSA</sub> e CHO<sub>CD36</sub>.

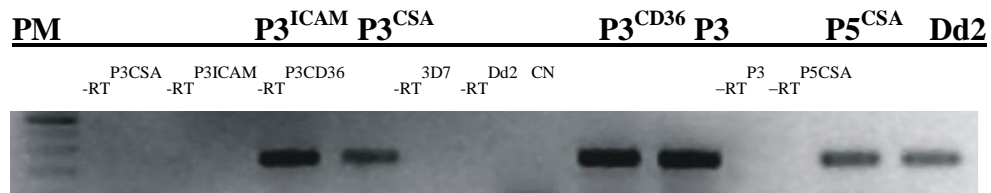
As reações de *transcriptase* reversa foram realizadas a partir de RT - PCR com amostras de RNA dos isolados e das linhagens dos isolados previamente selecionados: P59<sub>ICAM-1</sub>, P59<sub>CSA</sub>, P59<sub>CD36</sub>, P5<sub>ICAM-1</sub>, P5<sub>CSA</sub>, P5<sub>CD36</sub> e P3<sub>ICAM-1</sub>, P3<sub>CSA</sub>, P3<sub>CD36</sub>. Nenhum produto da PCR foi obtido sem *transcriptase* reversa e indicaram a ausência de contaminação com DNA durante as preparações de RNA.

A confirmação da especificidade dos oligonucleotídeos foi confirmada através do gel de agarose 1,5% (figura 16A-B).

A



B



**Figura 16 (A):** RT-PCR da região do último exon do gene *Pfclag9* de *P.falciparum* dos isolados dos pacientes P59, P5 e P3 antes e após *panning* previamente selecionados para os receptores P59<sup>CD36</sup>, P59<sup>CSA-K1</sup>, P59<sup>ICAM-1</sup>, P59, P5<sup>CD36</sup>, P5, P5<sup>ICAM-1</sup>.

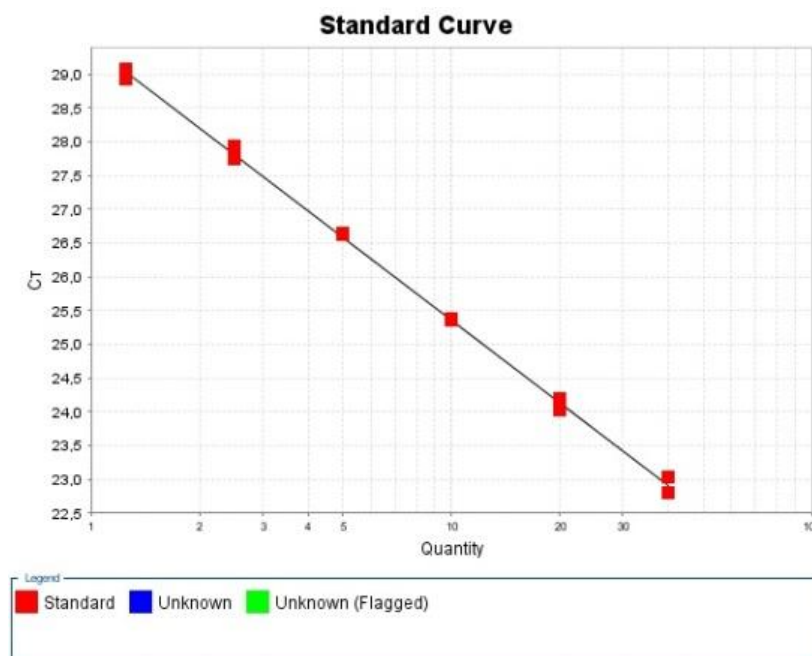
Em (B): o isolado do paciente, P3<sup>ICAM-1</sup>, P3<sup>CSA</sup>, P3<sup>CD36</sup>, P3, P5<sup>CSA-K1</sup>, cepas 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*, e o (-) RT de cada amostra e controle negativo (CN). O peso molecular corresponde a 100 pares de base (pb).

As avaliações das medidas de expressão do gene *Pfclag9* foram realizadas juntamente com a de expressão de genes normalizadores, ou constitutivos, a saber, o gene *Seryl-tRNA synthetase* (SER), actina (ACT) e *Fructose biphosphate aldolase* (FRUT), o perfil de cada curva correspondente à dissociação de cada região analisada dos genes. Os gráficos foram gerados pelo *Software* da Applied Biosystems. Foi avaliada a presença de um pico em todos os ensaios o que indica uma amplificação específica de cada *amplicon* e ausência de dímeros ou produtos inespecíficos.

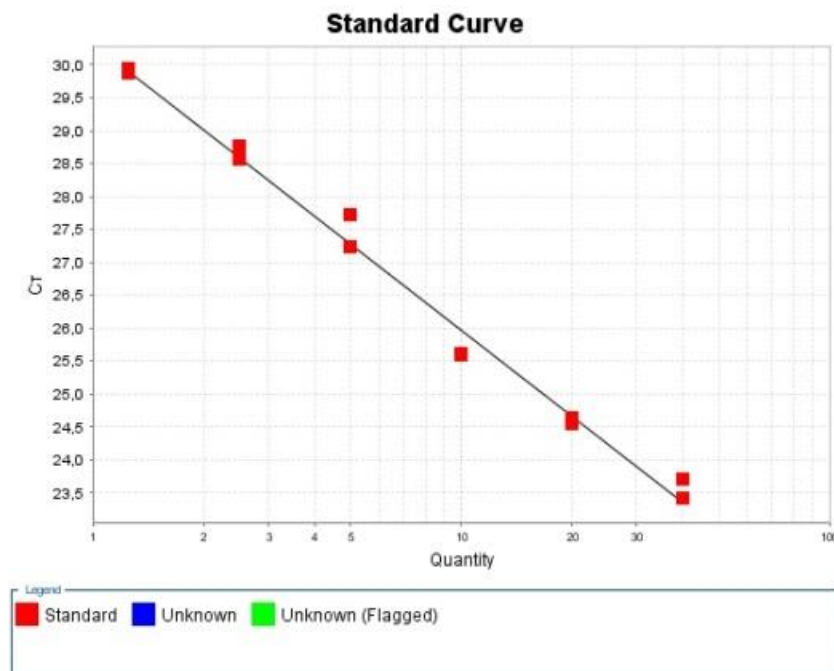
Foi preparada curva com as diluições seriadas, a partir de amostras de cDNA da cepa de referência 3D7 de *P. falciparum* no estágio de trofozoítos maduro e esquizontes, resultando em diferentes concentrações de cDNA. Os resultados dos Cts podem ser obtidos em um gráfico com os resultados para a escolha da melhor concentração, entre os oligonucleotídeos testados.

Avaliamos a regressão linear da reta com o objetivo de obter a eficiência da PCR para cada gene, através da obtenção do coeficiente angular de acordo com a equação:  $E10(-1/slope)$ . Nesta equação, o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do Ct dos transcritos alvo e normalizador em função *log* de diferentes concentrações de cDNA do *Pfclag9* nas concentrações finais. Os ensaios foram realizados para cada região do gene *Pfclag9* (exon 8 e exon 9) e os normalizadores.

Foi observada a eficiência durante o estudo da expressão, pois o objetivo é obter dados confiáveis, uma vez que as reações da PCR podem obter eficiência de 100%, como se deseja. Observamos a relação entre a concentração do cDNA e os valores de Ct (figura 17 (A) e (B)).



**Figura 17** (A) e (B) pExon: *Slope*: -3.32, eficiência % 98,7,  $R^2$ : 0,99.



(B) UExon: Slope: -3.32, eficiência % 99,4, R2:0,99

**Figura 17 (A) e (B):** Curva padrão para determinação da eficiência dos iniciadores referente (A) ao último exon (pExon 8) do gene *Pfclag9*. (B) penúltimo exon (UExon 9) do gene *Pfclag9*, que foi gerado pelo *Software 7500 SDS* (Applied Biosystems) versão 2.01.

Para os ensaios do quantitativo PCR em tempo real após transcrição reversa (RTqPCR) foram previamente testados 5 pares de iniciadores, para as regiões do exon 8 e 9 do gene *Pfclag9* e escolhemos os que apresentaram eficiência satisfatória de 1 ( $\pm 0.02$ ) dos quais selecionamos para avaliar a expressão das regiões do gene *Pfclag9* do ultimo exon 9 com eficiência de **99.4%** e penúltimo exon 8 com eficiência de **98,7%** (tabela 11).

**Tabela 11:** Valores de inclinação da curva (*Slope*), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e eficiência de cada iniciador selecionado para o estudo do gene *Pfclag9*.

<b>Código</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Slope</b>	<b>Eficiência</b>
<b>Mclag9</b>	0.97	-3.49	96,7%
<b>pExon 8</b>	0.99	-3.32	98,7%
<b>Nclag9</b>	0.98	-3.273	95,0%
<b>Bclag9</b>	0.98	-3.29	96,0%
<b>UExon 9</b>	0.99	-3.32	99.4%

Abreviações: Mclag9, Nclag9, Nclag9 e Uxon 9 código de identificação dos iniciadores correspondentes ao exon nove e Bclag9, pExon 8 correspondem a região do exon 8 do gene de interesse.

Foram selecionados três controles, os genes constitutivos cuja identificação de acesso corresponde: *Seryl-tRNA Synthetase*, (PF07\_0073), *Fructose biphosfatase aldolase* (PF14\_0425) e actina (PFL2215W) e observamos suas eficiências que corresponderam a aproximadamente 99% tabela 12.

**Tabela 12:** Valores de inclinação da curva (*slope*), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e eficiência da cada oligonucleotídeo selecionado para o estudo como gene constitutivo.

ID Acesso	R <sup>2</sup>	<i>Slope</i>	Eficiência
Seryl	0.98	-3,32	99,8%
Fructose	0.99	-3,32	99,0%
Actina	0.99	-3,33	99,6%

Abreviações: Seryl = *Seryl-tRNA synthetase*, *Fructose biphosfatase aldolase* (FRUT) e Actina (ACT).

Os resultados mostraram que a metodologia permite medir a expressão do gene *Pfclag9* entre os isolados e as linhagens dos isolados selecionados, permitindo a análise comparativa da expressão quantitativa.

#### 4.5.1. Comparação da expressão relativa do gene *Pfclag9* em linhagens dos isolados em relação à cepa 3D7 de *P. falciparum*.

As comparações entre a expressão do gene *Pfclag9* na cepa controle 3D7 foram em seguida utilizadas para realizar as medidas comparativas da expressão entre os isolados naturais e as linhagens dos isolados após *panning*. Quando observadas entre os grupos após seleção (*panning*) não houve alteração na expressão do gene *Pfclag9*. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e os dados são representativos de quatro ensaios independentes (n=12), tabela 13.

**Tabela 13:** Quantificação relativa do gene *Pfclag9* nas cepas 3D7, Dd2 de *P. falciparum* (comparado com gene *Seryl-tRNA synthetase*).

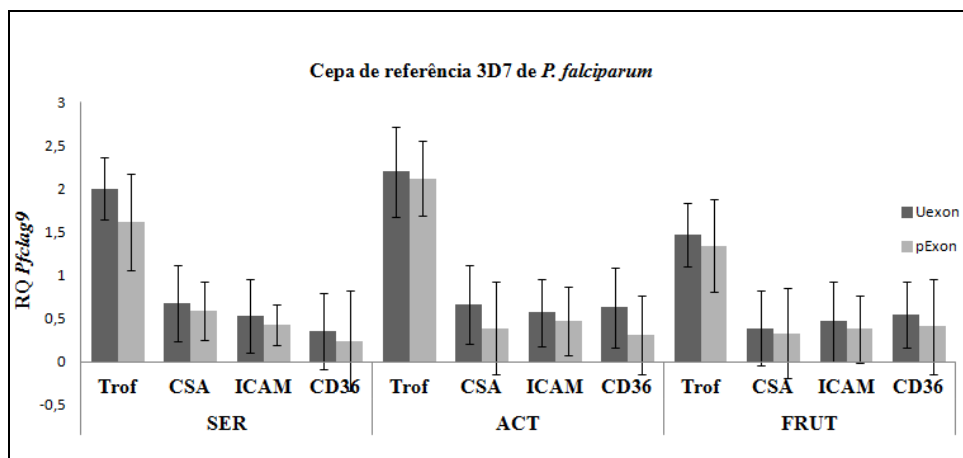
Cepa/ Origem	$\bar{x}$ Ct gene		RQ <sup>e</sup> ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
	<i>Pfclag9</i>	SER	
<b>3D7 Clone do NF54/MR4</b>	27.90 <sup>a</sup> (± 0.2) <sup>b</sup>	29.30 <sup>c</sup> (± 0.5) <sup>d</sup>	1.2*
<b>3D7<sub>CD36</sub></b>	28,18 (± 0.1)	30,12 (± 0.2)	0.97
<b>3D7<sub>CSA</sub></b>	28,55 (± 0.07)	31,45 (± 0.2)	0.54
<b>3D7<sub>ICAM-1</sub></b>	28,18 (± 0.1)	28,42 (± 0.5)	0.84
<b>Dd2 Indochina</b>	27.70 (± 0.1)	26.11 (± 0.4)	1.0
<b>Dd2<sub>CD36</sub></b>	29.74 (± 0.1)	30.68 (± 0.5)	0.66
<b>Dd2<sub>CSA</sub></b>	28.04 (± 0.1)	31.99 (± 0.2)	0.60
<b>Dd2<sub>ICAM-1</sub></b>	30.87 (± 0.1)	30.4 (0 ± 0.5)	0.51

<sup>a</sup> = Corresponde a média dos *Threshold cycle* – (Ct) da região do último exon do gene *Pfclag9* no estágio trofozoítos pós invasão (pi) 20h, <sup>b</sup> e <sup>d</sup> ± DP, <sup>c</sup> – média dos Ct da região do penúltimo exon, <sup>e</sup>=(RQ) quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , \* *Seryl tRNA synthetase* (controle endógeno).

#### 4.5.2 Quantificação relativa (RQ) da expressão do gene *Pfclag9* nos isolados dos pacientes P3, P5, P59 de *P. falciparum* relativo aos genes de referência *Seryl-tRNA Sintetase* (SER), *Actina* (ACT) e *Frutose biphosphatase aldolase* (FRUT).

A medida da expressão do gene *Pfclag9* (exon 9), normalizado pela expressão relativa dos genes constitutivos *Seryl-tRNA synthetase* (SER), *Actina* (ACT) e *Frutose biphosphatase aldolase* (FRUT) da cepa 3D7 e do isolado do paciente P3 de *P. falciparum* é representada na figura 18 e figura 19.

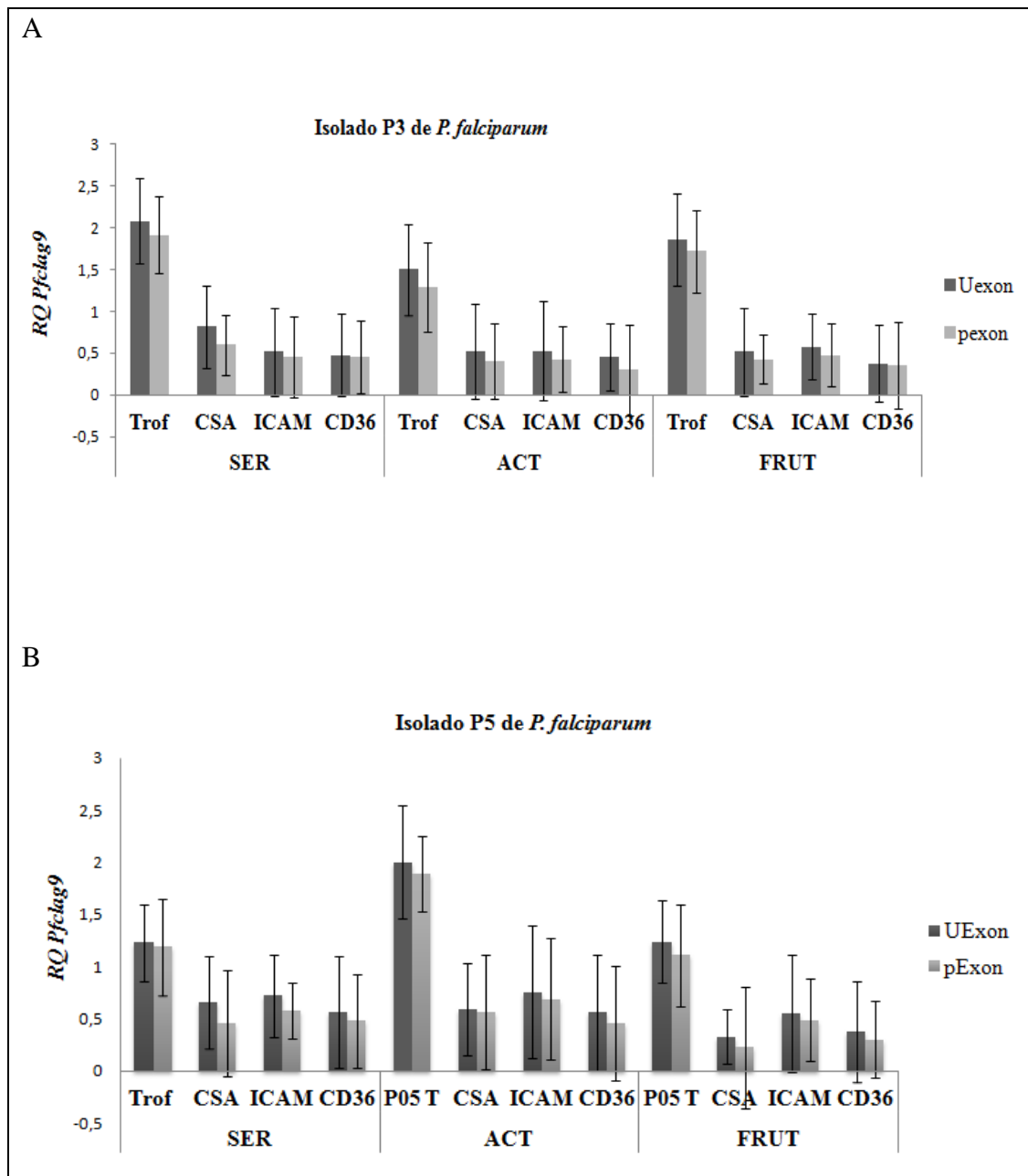
Neste experimento foi utilizado o método delta e delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), os dados foram gerados utilizando amostras em triplicatas em quatro experimentos independentes. Entre os grupos com trofozoítos maduros após invasão, em condições de cultivo sem seleção e o grupo das linhagens dos isolados selecionados após *panning* nos receptores CHO<sub>CSA-K1</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub> e CHO<sub>CD36</sub>.

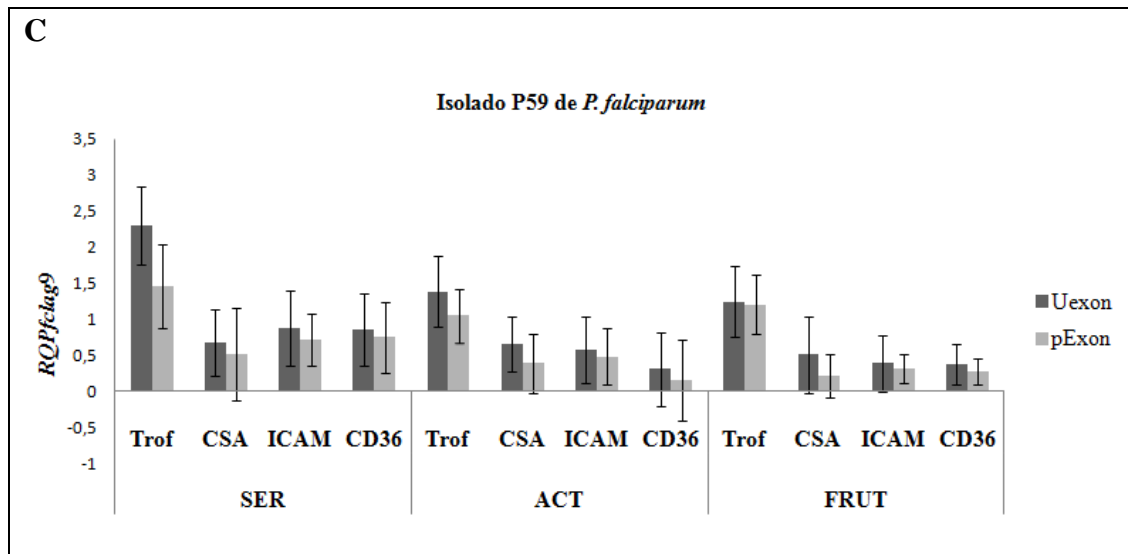


**Figura 18:** Quantificação relativa do gene *Pfclag9* que foi realizada no estágio de trofozoítos maduros em condições de culturas *in vitro*, cepa 3D7 de *P. falciparum* e comparamos com as linhagens selecionadas após *panning* para os respectivos receptores CHO<sub>CSA-K1</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub> e CHO<sub>CD36</sub>, os ensaios do quantitativo PCR em tempo real relativo aos genes normalizadores *Seryl-tRNA Synthetase*, actina (ACT) e *Fructose biphosphatase aldolase* (FRUT). Utilizamos o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e os ensaios foram repetidos em 4 experimentos independentes em triplicatas  $\pm$  Desvio padrão.



Apresentamos os dados sobre os ensaios realizados com os isolados e as linhagens isoladas dos pacientes P3, P5 e P59 de *P. falciparum* que apresentaram o mesmo padrão de expressão entre o exon 8 e 9. (figura 19 (A), (B) e (C))



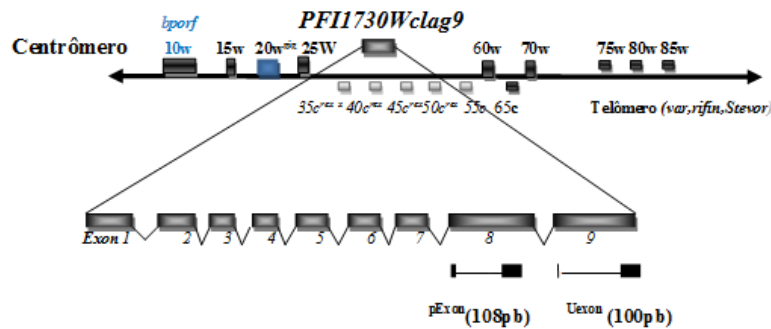


**Figura 19 (A), (B) e (C):** Quantificação relativa do gene *Pfclag9* que foi realizada no estágio de trofozoítos maduros em condições de culturas *in vitro*, pós-invasão, que foram coletados sem seleção do isolado P3, P5 e P59 de *P. falciparum* e suas linhagens isoladas previamente selecionadas após *panning* para os receptores CHO<sub>CSA-K1</sub>, CHO<sub>ICAM-1</sub> e CHO<sub>CD36</sub>, realizamos os ensaios do quantitativo PCR tempo real, relativo aos genes normalizadores *Seryl-tRNA synthetase*, Actina (ACT) e *Fructose biphosfatase aldolase* (FRUT). Utilizamos o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e os ensaios foram repetidos em quatro experimentos independentes em triplicatas, os dados das amostras analisadas a partir das médias e  $\pm$  Desvio padrão, mostraram baixa expressão relativa do gene *Pfclag9* quando comparados entre as regiões do exon 8 e 9.

A quantificação do gene *Pfclag9* por quantitativo PCR após transcrição reversa mostrou baixos níveis de expressão desse gene nessas condições tanto na cepa de referência 3D7 quando comparada com as que sofreram *panning* para os respectivos receptores de interesse.

O mesmo ensaio foi testado entre as linhagens isoladas de pacientes que foram previamente selecionados durante o cultivo, para um receptor específico ou preferencial após o *panning* e a expressão do transcrito *clag9* diminuem após o *panning*. Os dados foram apresentados com  $\pm$  desvio padrão da média e os dados são representativos de quatro ensaios independentes (n=12). A expressão do gene

*Pfclag9* foi observada somente no estágio de trofozoíto maduro do isolado do paciente P3, P5, P59 e da cepa 3D7 de *P. falciparum*. Os ensaios da PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR) foram realizados para a região do exon 8 (penúltimo exon) e exon 9 (último exon) do gene *Pfclag9* (**Figura 20** (A) e (B)).



B



**Figura 20** (A): Mapeamento da região do cromossomo 9 (NACER et al., 2011 adaptada). Em (B) Confirmação do tamanho dos fragmentos dos produtos da PCR das regiões do gene *Pfclag9* do isolado P59 e sub isolados P59<sub>ICAM</sub>, P59<sub>CSA</sub> e P59<sub>CD36</sub>, gel agarose 2% corado com brometo de etídio, avaliamos cada amostra independente em relação a cada controle endógeno, na sequência marcador de peso molecular de 100pb (M) e as regiões do gene, os fragmentos correspondem aos esperados, no penúltimo exon (108pb), último exon (100pb), actina (ACT-160pb), *Seryl tRNA synthetase* (SER-158pb) e *fructose biphosphatase aldolase* (FRUT-167 pb), controles positivos cepa de referência 3D7, Dd2 no estágio de trofozoítos maduros, mix (controle negativo) e cepa 3D7 no estágio de esquizontes.

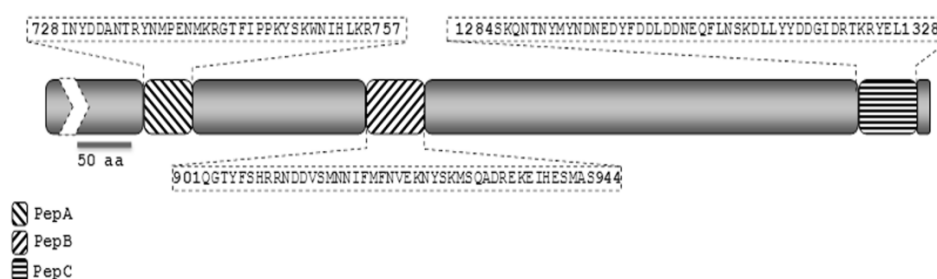
Em síntese, foi possível verificar que a expressão do gene *Pfclag9* nas linhagens analisadas derivadas dos isolados com especificidade aos diferentes receptores não apresentou alteração da expressão relativa do gene de interesse, não havendo, portanto, indução de maior ou menor expressão do gene *Pfclag9* correlacionado a especificidade citoaderente do respectivo parasito.

#### 4.6. Análise de funções dos produtos do gene *Pfclag9* no desenvolvimento de respostas imunes.

Grupos da Australia tinham previamente pesquisado onze peptídeos sintéticos correspondentes a região com 119 aminoácidos (11 peptídeos sobrepostos entre as posições 1046 – 1165) entre dois putative domínios transmembrana do *clag9*, dos quais foram relacionados a resposta protetora humoral. (TRENHOLME et al., 2005)

##### 4.6.1. Estrutura dos peptídeos sintéticos representando ou contendo epitopes B potenciais do gene *Pfclag9*

Os peptídeos sintético foram definidos a partir das análises bioinformáticas da sequência identificada PlasmoDB de (ID PFI1730w) e NCBI (GI: 167963009). Foram selecionados três peptídeos denominados A, B e C utilizados nesta etapa cujas sequências e posições na molécula são mostradas na (figura 21).



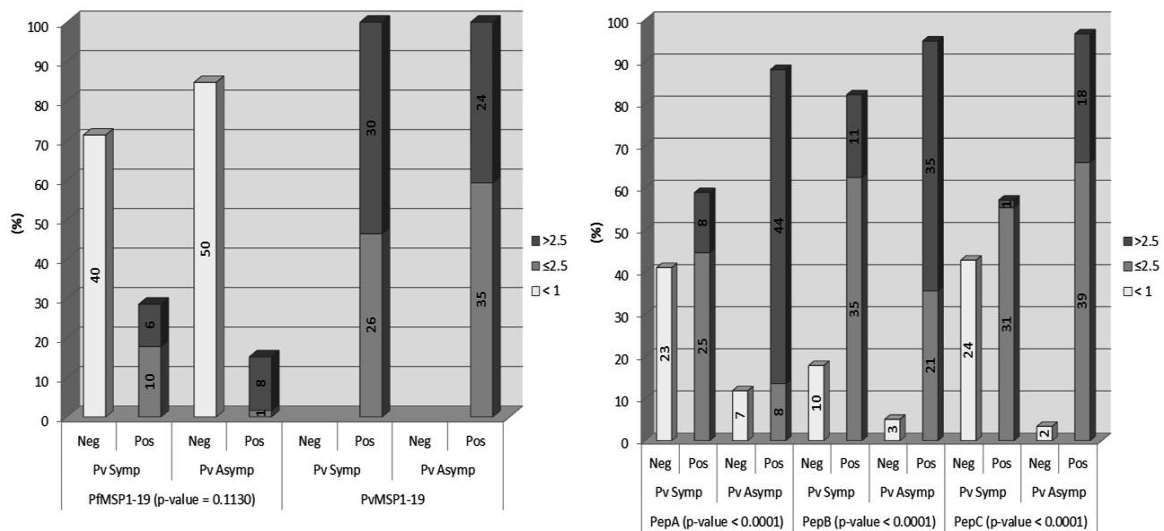
**Figura 21:** Peptídeo A correspondendo a uma região de 32 aminoácidos entre os resíduos 728 - 760, peptídeo B região com 43 aminoácidos entre os resíduos 901 - 944, peptídeo C região com 56 aminoácidos entre os resíduos 1284 - 1340 da proteína CLAG9.

#### **4.6.2. Avaliação de anti-PfCLAG9 no soro de pacientes sintomáticos e portadores assintomáticos de parasitos da malária**

Foram realizados testes de ELISA para verificar se a presença de anticorpos contra peptídeos representando epitopos lineares de CLAG9, descritos em pacientes semimunes e imunes à malária falciparum em Papua Nova Guiné (TRENHOLME et al., 2005) poderia ser observada também nos pacientes da região de Porto Velho - Rondônia (PVH). Observou-se que, elevados títulos de anticorpos contra os peptídeos sintéticos A, B e C correspondentes a diferentes regiões da proteína CLAG eram observados em pacientes portadores assintomáticos de *P. falciparum* (figura 21 e tabela 14).

Observamos, entretanto, igualmente, a princípio utilizando para controle alguns soros de pacientes com malária vivax e, em seguida, utilizando amostras representativas de soros de pacientes com malária vivax sintomáticos e em portadores assintomáticos de *P. vivax*, que anticorpos anti CLAG9 de *P. falciparum* eram encontrados em pacientes com formas clínicas de malária vivax e, em pacientes portadores assintomáticos do parasito.

Embora anticorpos anti CLAG9 fossem detectados em ambos, tanto pacientes clínicos quanto portadores assintomáticos de parasitos, verificou-se que o índice de reatividade (IR) em portadores assintomáticos era 1,5 a 3 vezes maior do que em pacientes com formas clínicas, tanto de malária falciparum como de malária vivax. (figuras 22 e tabela 14).



**Figura 22:** Frequência e níveis de anticorpos contra PfCLAG9 e contra proteínas recombinante de MSP1-19 em pacientes sintomáticos e assintomáticos de *P. falciparum*. Os valores negativos ( $RI < 1$ ) e positivos ( $RI \geq 1$ ). Os dados foram analisados utilizando teste exato de Fisher. *P. vivax* Symp: Pacientes portadores de infecção sintomática por *P. vivax*; Pv Asymp: Pacientes portadores assintomáticos por malária vivax.

Para verificar se a presença de anticorpos anti-CLAG9, em pacientes da malária vivax fosse devido a infecções passadas de malária falciparum, realizamos igualmente o teste de ELISA com os antígenos recombinantes MSP-1<sub>19</sub> de *P. vivax* e *P. falciparum*. Os resultados são mostrados na figura 23 e na tabela 15.

Os resultados obtidos demonstram que apenas 25 (n=115) apresentaram resposta para PFMSP<sub>1-19</sub>. A diferença entre as médias dos assintomáticos e sintomáticos foi estatisticamente não significativa pelo teste de Mann-Whitney U ( $p = 0,0579$ ). Assim como nos peptídeos sintéticos, as médias foram maiores em assintomáticos.

O mesmo perfil não foi observado entre as amostras portadoras de *P. falciparum*, onde 46 (n=110) apresentaram resultados positivos para uma infecção prévia, sem que houvesse uma diferença estatisticamente diferente ( $p = 0,1361$ ) entre amostras sintomáticas e assintomáticas.

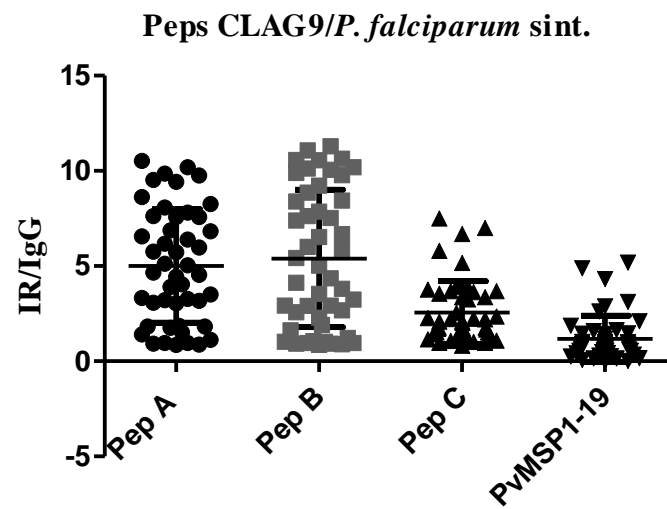
Em todas as análises, há uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparamos os resultados obtidos entre as amostras assintomáticas e sintomáticas. Os dados demonstraram que a reatividade dos peptídeos A, B e C são maiores em pacientes portadores assintomáticos quando comparados com portadores sintomáticos ( $p < 0,05$ ), exceto em pacientes portadores de *P. falciparum* com relação ao peptídeo A, que apresenta média menor.

#### **4.7. Especificidade da resposta humoral contra CLAG9**

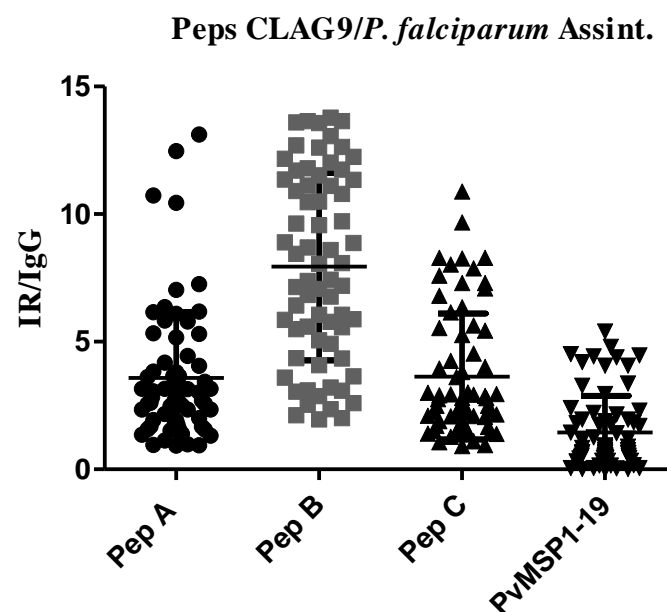
Considerando a existência de malária vivax e falciparum na área endêmica dos pacientes estudados, é possível que a reatividade contra o antígeno de *P. falciparum* observado em pacientes de malária vivax representasse resposta imune a infecções precedentes nos mesmos pacientes.

Essa eventualidade foi investigada com a pesquisa de anticorpos contra o antígeno MSP1, em particular contra o fragmento 19 kDa de ambas as moléculas MSP1<sub>19</sub> de *P. falciparum* e de *P. vivax*, bastante estudados entre pesquisadores interessados na produção de vacinas contra malária.

Verificamos, entretanto que nas tabelas 14 e 15 apenas uma pequena minoria de pacientes portadores assintomáticos de *P. vivax* apresentava reação positiva de anticorpos contra MSP1-19 de *P. falciparum* e que, nesse caso, os valores de índice de reatividade (RI) no soro dos pacientes positivos para os dois antígenos, era particularmente elevado contra o peptídeo B de PfCLAG9 (figuras 23 (A) e (B) e figuras 24 (A) e (B)).



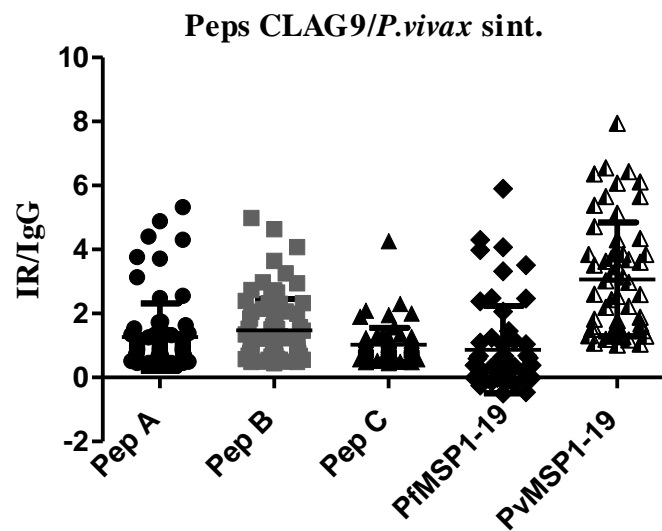
B



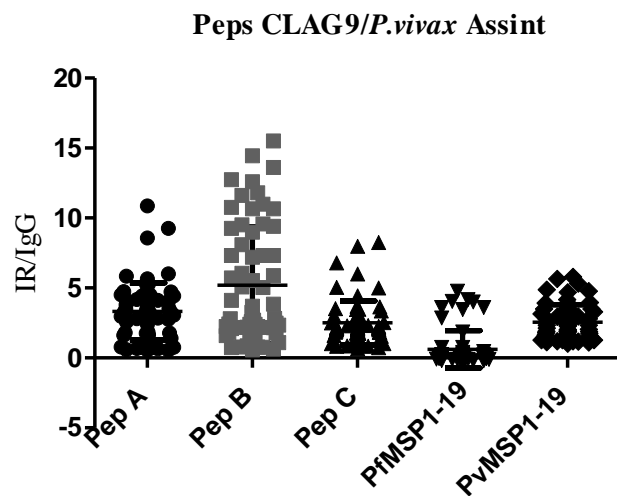
**Figura 23:** (A) e (B) Análise dos anticorpos contra os peptídeos sintéticos A, B e C correspondentes a diferentes regiões da proteína PfCLAG9 e contra proteínas recombinante de PvMSP1-19 em pacientes sintomáticos (sint.) e assintomáticos (Assint.) de *P. falciparum*. Os valores negativos ( $RI < 1$ ) e positivos ( $RI \geq 1$ ). Os dados foram analisados utilizando amostras de pacientes N= 47/42 Pep A, N= 47/41 Pep B, N= 47/44 Pep C. Para os Assint. N= 68/64 Pep A, 68/68 Pep B e Pep C 68/66, N= 68/29 PvMSP1-19. As barras mostram à média e o DP das amostras analisadas.



A



B



**Figura 24:** Análise dos anticorpos contra os peptídeos sintéticos A, B e C correspondentes a diferentes regiões da proteína PfCLAG9 e contra proteínas recombinante de MSP1-19 em pacientes sintomáticos (Sint.) e assintomáticos (Assint.) de *P. vivax*. Os valores negativos ( $RI < 1$ ) e positivos ( $RI \geq 1$ ). Os dados foram analisados utilizando amostras de pacientes sint. N= 76/33 Pep A, N= 76/46 Pep B, N= 76/32 Pep C, N= 76/16 PfMSP 1-19 e N= 76/56 PvMSP1-19. Para os

Assint. N= 63/52 Pep A, 63/56 Pep B e Pep C 63/57, e N= 63/9 PfMSP 1-19 N= 63/59 PvMSP1-19. As barras mostram a média e o DP das amostras analisadas. .

**Tabela 14:** Reatividade dos soros nos ensaios de ELISA com *P. falciparum* e *P. vivax* sintomáticos e assintomáticos contra os peptídeos A, B e C do CLAG9. Os valores de *p* são mostrados utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney U.

Não paramétrico											
Teste Mann-Whitney											
Peptídeos PfCLAG9	Grupo de Pacientes	N	Média	95% °CI		Valor de <i>p</i>	N	Média	95% °CI		Valor de <i>p</i>
				Abaixo	Acima				Abaixo	Acima	
A	<sup>a</sup> Sint	42	5.494	4.630	6.357	0.0004	33	1.978	1.527	2.430	0.0001
	<sup>b</sup> Assint	64	3.747	3.101	4.392		52	3.872	3.368	4.375	
	<b>Total</b>	<b>106</b>	<b>4.439</b>	<b>3.903</b>	<b>4.975</b>		<b>85</b>	<b>3.137</b>	<b>2.735</b>	<b>3.538</b>	
B	Sint	41	6.055	4.982	7.128	0.0094	46	1.963	1.672	2.255	0.0001
	Assint	68	7.940	7.052	8.829		56	5.745	4.647	6.842	
	<b>Total</b>	<b>109</b>	<b>7.231</b>	<b>6.534</b>	<b>7.928</b>		<b>102</b>	<b>4.039</b>	<b>3.327</b>	<b>4.752</b>	
C	Sint	44	2.667	2.165	3.169	0.0141	32	1.384	1.154	1.614	0.0001
	Assint	66	3.718	3.113	4.324		57	2.687	2.276	3.099	
	<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>3.298</b>	<b>2.877</b>	<b>3.729</b>		<b>89</b>	<b>2.219</b>	<b>1.916</b>	<b>2.522</b>	

Abreviações: <sup>a</sup>Sint: sintomáticos, <sup>b</sup>Assint: assintomáticos, <sup>c</sup>CI, Intervalo de confiança, peptídeos sintéticos da proteína PfCLAG9 Pep A, Pep B, Pep C, PfMSP1-19, PvMSP1-19, Proteína de Superfície de Merozoíto de *P. falciparum* e *P. vivax* respectivamente.

**Tabela 15:** Reatividade dos soros de pacientes de *P. falciparum* e *P. vivax* sintomáticos e assintomáticos contra antígenos recombinantes de MSP1<sub>-19</sub> de ambos os parasitas. Os valores de *p* são mostrados utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney U. Os valores positivos ( $RI \geq 1$ ).

Não paramétrico											
Teste Mann-Whitney											
		<i>P. falciparum</i>					<i>P. vivax</i>				
Peptídeos	Grupos	N	Média	95% °CI		Valor de <i>p</i>	N	Média	95% °CI		Valor de <i>p</i>
<b>PfMSP1-19</b>	<sup>a</sup> Sint	-	-	-	-	-	16	2.598	1.819	3.376	0.0579
	<sup>b</sup> Assint	-	-	-	-	-	9	3.604	2.957	4.252	
	<b>Total</b>	-	-	-	-	-	<b>25</b>	<b>2.96</b>	<b>2.404</b>	<b>3.516</b>	
<b>PvMSP1-19</b>	Sint	17	2.287	1.586	2.988	0.1361	56	3.068	2.591	3.545	0.2513
	Assint	29	2.767	2.271	3.262		59	2.556	2.231	2.880	
	<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>2.589</b>	<b>2.194</b>	<b>2.985</b>		<b>115</b>	<b>2.805</b>	<b>2.520</b>	<b>3.090</b>	

Abreviações: <sup>a</sup>Sint: sintomáticos, <sup>b</sup>Assint: assintomáticos, ° CI, Intervalo de confiança, MSP1<sub>-19</sub>, PvMSP1<sub>-19</sub>, Proteína de Superfície de Merozoíto de *P. falciparum* e *P. vivax* respectivamente.

#### 4.8. Bases moleculares da reação cruzada de anticorpos contra PfCLAG9

Para investigar uma base molecular na reação cruzada de anticorpos anti PfCLAG9 no soro de pacientes de malária por *P. vivax* procedemos com a pesquisa em bancos de dados de antígenos de *Plasmodium* e verificamos que, os peptídeos sintéticos A, B e C apresentavam seqüências com alto grau de similaridade com as regiões correspondentes de antígenos PvCLAG7 e PvCLAG8 de *P. vivax*, a identidade chegando a níveis de 84% no peptídeo B de PfCLAG9. PvCLAG7 pode assim ser considerado ortólogo *P. vivax* de PfCLAG9 (figura 25).

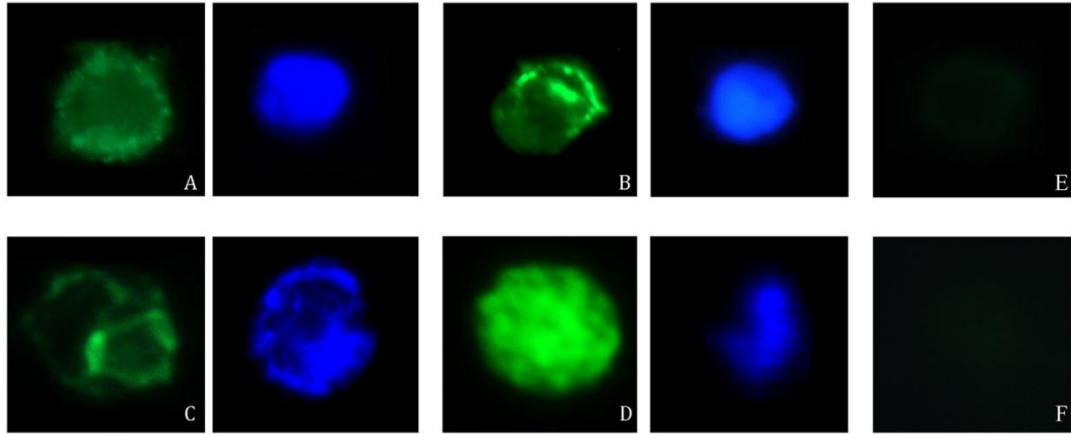
720      730      740 PvCLAG7 PepA INVEHPKGRYNMQKEQKKGKVFAPKYSKWTLHLKK INYDDANTRYNMPENMKRGTFIPPKYSKWNILHKK ***: : **** : : * * * : **** * : *** Similarity: 27 is 77,14 %	730      740      750      758 PvCLAG8 PepA INYDNEFARNRMRDNIKSGNFVAPKYQKWNLVLR INYDDANTRYNMPENMKRGTFIPPKYSKWNILHKK :***: : * * * : * * * : * * * : * * * Similarity: 25 is 71,42 %
890      900      910      920      930 PvCLAG7 PepB QYSFFSHRRNDDISMNNIFFFSVRQDYSKLKKVREEEIHLMSMAS QGTYFSHRRNDDVSMNNIFMNVKKNYSKMSQADREKEIHESMAS * : : **** * : **** * : * * : * * : * * : * * : * * Similarity: 38 is 84,44 %	900      910      920      930      940 PvCLAG8 PepB ENSFGVQRRNDEMSSLNIFFFVNSVSNYSKMSKEEREEIHNMSMS QGTYFSHRRNDDVSMNNIFMNVKKNYSKMSQADREKEIHESMAS : : : **** * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * Similarity: 39 is 86,66 %
1280      1290      1300      1310      1320 PvCLAG7 PepC -QNNSSLFYVDNESLFDLDDDEQFLNQRDIIIFYDDNIDKRGIVNFV SKQNTINMYNDNEDYFDLDDNEQFLNSKDLLVYDDGIDRTKRYEL- : * : * * * * : **** * : **** * : * : * * * * : * : * Similarity: 35 is 74,44 %	1290      1300      1310      1320      1330 PvCLAG8 PepC LLKNAYSFYVDDASFFDDLGEEEKFLNDKYYISTN----- SKQNTINMYNDNEDYFDLDDNEQFLNSKDLLVYDDGIDRTKRYEL : * : * * : **** * : **** * : * : * * * * : * : * Similarity: 23 is 50,00 %
A	B

**Figura 25:** Similaridade entre as seqüências dos peptídeos sintéticos A, B e C das regiões da proteína PfCLAG9 comparando com as regiões correspondentes do PvCLAG7 localizado no cromossomo 7 (A) e CLAG8 localizado no cromossomo 8 (B).

#### 4.9. Reatividade cruzada de anticorpos murinos induzidos por peptídeos sintéticos de PfCLAG9 contra alvos moleculares nos eritrócitos infectados por *P. falciparum* ou *P. vivax*.

Para determinar se a reatividade cruzada observada com soros humanos provinha da mesma população de anticorpos ou de populações diferentes procedeu-se a imunização de camundongos BALB/c contra os peptídeos sintéticos A, B e C da proteína PfCLAG9. Como pode ser observado na (figura 26 B/D), os anticorpos murinos anti peptídeo B reconhecem epitopos nos trofozoítos maduros (figura 26 A/C) e equizontes tanto de *P. falciparum* quanto de *P. vivax* e de (B/D), enquanto eritrócitos não infectados não são reconhecidos. Cabe ressaltar que a imunofluorescência foi conduzida na presença

de baixas concentrações de Tween 20 tornando impossível concluir se os epítomos reconhecidos são de fato expostos na superfície dos eritrócitos infectados ou na parte interna.



**Figura 26:** Imunofluorescência indireta utilizando soro policlonal de camundongos BALB/c imunizados contra peptídeo sintético B da proteína PfCLAG9 e “goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488” nos trofozoítos e esquizontes de *P. vivax* (A/C), *P. falciparum* (B/D), controles negativos eritrócitos não infectados de *P. vivax* e *P. falciparum* (E/F).

## **5. DISCUSSÃO**

A denominação *clag* (*cytoadherence-linked asexual gene*) foi utilizada na década de noventa do século passado por autores australianos (SHIRLEY et al., 1990) para identificar a mutação de um suposto gene de *Plasmodium falciparum* em linhagens isoladas em cultura, responsável pela falha na aderência ao receptor endotelial CD36. A não aderência a CD36, entretanto, mostrou-se relacionada a uma deleção do isolado D10 da região sub-telomérica do cromossomo nove.

A estrutura particular do gene *clag* e as homologias observadas nas análises das sequências nucleotídicas de vários isolados de *P. falciparum* em particular, da cepa 3D7, permitiram rapidamente a descrição de outros genes da família *clag*, identificados no genoma de *P. falciparum*. Por outro lado, a identificação de genes da família *clag* em parasitos da malária de roedores (KANEKO et al., 2001, LING et al., 2004) permitiu a descoberta da localização das proteínas CLAG nas róprias dos merozoítos, em associação com o complexo das proteínas da família RhopH1 (COMEAX et al., 2011; KANEKO et al., 2007).

Os estudos com plasmódios de roedores, nos quais não se observa a citoaderência e resultados experimentais com *P. falciparum* de vários laboratórios, criaram dúvidas sobre a função da citoaderência atribuída ao produto do gene *Pfclag9* (LING et al., 2004).

A observação das sequências altamente conservadas observada no presente estudo, na região do exon 9 do gene *Pfclag9* correspondente a 63 aminoácidos (189pb) nos isolados de *P. falciparum* dos pacientes e suas linhagens selecionadas (figura 12 e 13), concordam com o estudo de (MANSKI-NANKERVIS et al., 2000), que observou elevada conservação nos isolados de várias localidades.

Estudos mais recentes demonstraram, finalmente, que a ausência de citoaderência do isolado D10 portadores da deleção depende de outro(s) gene(s) da região deletada e não de *Pfclag9* (COMEAX et al., 2011; NACER et al., 2011).

Partindo da premissa que estes estudos tenham afastado a proposição original atribuindo ao produto do gene *Pfclag9* de constituir uma molécula citoaderente ao receptor endotelial CD36, não eliminam uma possível participação indireta no(s) processo(s) geral (is) relacionado(s) à citoaderência da cepa 3D7 (figura17) ou isolados de campo P3, P5 e P59 (figura 18). Assim, um dos objetivos no presente trabalho foi o de examinar em amostras isoladas de pacientes a possibilidade do envolvimento do gene *Pfclag9* nesse processo medindo sua transcrição diferencial em linhagens com perfis de citoaderência diferentes.



O estudo de GOEL et al (2010), por exemplo, conduziu por um lado à demonstração da localização final da proteína CLAG9 na membrana do eritrócito infectado por estágios trofozoítos maduros e esquizontes do *P.falciparum*. O estudo revelou que as extremidades C ou N terminais da molécula ficam expostas ao exterior do eritrócito infectado e, por outro lado, os autores mostram um papel de CLAG9 no transporte da proteína variante VAR2CSA até a membrana do eritrócito parasitado.

Os resultados apreendidos até o momento não se apresentam como compatíveis com esta interpretação. Assim, o próprio GOEL et al (2010) relembram dados de SALANTI et al (2003) mostrando uma ativação da expressão do gene *var2csa* nos parasitos citoaderentes à CSA.

Se CLAG9 agisse como chaperona específica do antígeno variante VAR2CSA, deveria haver uma maior expressão do gene *Pfclag9* nas linhagens, por nós obtidos, expressando VAR2CSA e nossos dados demonstraram um expressão de *Pfclag9* equivalente em sub isolados previamente selecionados para os receptores (tabelas 9 e 10). Entretanto, nosso estudo carece da afirmação se o parasito selecionado para citoaderência em CHO-K1 que possui CSA na sua superfície, de fato ativou *var2csa*. GÖLNITZ et al., (2008) mostraram que parasitos 3D7 selecionados em CHO-K1 não transcreveram quantidades notáveis de *var2csa*.

Expressão de VAR2CSA foi alcançada por outros pelo *panning* do isolado NF54 em CSA imobilizado SALANTI et al., (2003) ou por citoaderência em células com CSA seguido por eluições com CSA solúvel, por exemplo CARVALHO et al., (2010). Assim sendo, a queda na transcrição de *Pfclag9* por nós observados neste estudo, (Figuras 17 e 18), pode até corroborar os dados de Goel porque na ausência de transcrição de *var2csa* esperado possivelmente para todas nossas linhagens, haveria menor transcrição de *Pfclag9*.

Como recentemente demonstrado para CLAG3.1 e CLAG3.2, outro membro da família *clag*, (NGUITRAGOOL et al., (2011), a associação da proteína à membrana do glóbulo vermelho parasitado está ligada com funções de estabelecimento de canais aniônicos (*Plasmodial Surface Anion Channel*) essenciais para a nutrição do parasito intracelular. Os nossos resultados sobre a transcrição do gene *Pfclag9* não permitem mais afirmações além dos existentes sobre algum papel na remodelação do eritrócito parasitado. CLAG9 não é essencial para sobrevivência do parasito em cultivo, entretanto, a presença e a transcrição do gene em todos os

isolados de campo aqui testados apontam que PfCLAG9 possa ter um papel na sobrevivência do parasito no seu hospedeiro natural. Por motivos éticos, não foi possível testar esta hipótese.

Os resultados de nossas pesquisas, relativos ao papel de CLAG9 na indução de anticorpos relacionados à imunidade protetora na infecção malárica, suscita a possibilidade de uma nova perspectiva a ser explorada em relação a suas funções. Esses resultados foram obtidos em pacientes de Porto Velho – Rondônia: a presença de anticorpos contra epítomos B lineares na proteína CLAG 9, descritos em pacientes imunes e semi imunes de Papua Nova Guiné (TRENHOLME et al., 2005) e confirmados na Colômbia pela equipe de Patarroyo (MORENO-PEREZ et al., 2011; PINZÓN et al., 2010).

Efetivamente, nossas análises sorológicas em amostras de pacientes com malária falciparum (tabela 14 e 15) e de portadores assintomáticos de parasitos de *P. falciparum* em áreas endêmicas de Porto Velho confirmam esses resultados, mas, ao mesmo tempo, demonstram que os anticorpos provavelmente induzidos por PfCLAG9 apresentam reação cruzada (figura 22) contra um antígeno de *P. vivax* (tabela 14 e figuras 24,25 e 26).

Para investigar uma possível base molecular da reação cruzada de anticorpos anti PfCLAG9 no soro de pacientes de malária procedemos a pesquisa em bancos de dados de antígenos de *Plasmodium* e verificamos que os peptídeos sintéticos A, B e C apresentavam sequências com elevado grau de similaridade com as regiões correspondentes de PvCLAG7 e PvCLAG8 de *Plasmodium vivax* (figura 25) a identidade chegando a níveis de 84% no peptídeo B de PfCLAG9, PvCLAG7 pode assim ser considerado ortólogo *P. vivax* de PfCLAG9.

Além disso, o emprego de critérios seletivos rigorosos (LARSEN et al., 2006) para a definição de peptídeos sintéticos utilizados como imunógenos para camundongos BALB/c e para antígeno nas análises sorológicas de ELISA permitiu medidas dos índices de reatividade que demonstraram, em soros de pacientes com malária *P. vivax* e *P. falciparum*, que o nível de reatividade dos anticorpos com reatividade cruzada são 1.5 a 3 vezes maiores que pacientes portadores assintomáticos de parasitos do que em pacientes com infecções clínicas agudas de ambas as espécies de malárias (tabela 15).

Nossa hipótese é que a reação cruzada observada para anticorpos presentes no soro de pacientes portadores de malária causada por *P. falciparum* e *P. vivax* e nos anti-soros induzidos em camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos de PfCLAG9 seja devido a similaridade de estrutura entre as proteínas PfCLAG9 e PvCLAG7. Estas seriam homólogas,

como anteriormente proposto no estudo MORENO-PEREZ et al (2011) e provavelmente desempenham funções importantes em ambas as espécies do parasito.

Um ponto a ser considerado, uma vez demonstrada a existência dessa reação cruzada entre antígenos de parasitos de vivax e falciparum por hipótese os ortólogos PfCLAG9 e PvCLAG7, é o de saber se ela corresponde um fenômeno comum e sem relevância ou indicam um processo importante nas relações entre parasitos nas infecções mistas que são relativamente frequentes em área endêmica.

Estudos anteriores em Papua New Guinea em pacientes semi-ímmunes portadores de infecções mistas mostraram que a densidade parasitária de todas as espécies de *Plasmodium* oscilava, nas infecções mistas, dentro de limites e que os picos das infecções com cada espécie não são coincidentes (BRUCE et al., 2000, BRUCE & DAY 2003). Os autores propuseram que a parasitemia da malária é controlada por um sistema dependente da densidade parasitária nesses pacientes que depende de um mecanismo de regulação interespecífico envolvendo antígenos do tipo variante.

A existência de sistemas de regulação entre espécies diferentes de Plasmódios em infecções mistas foram igualmente sugeridas por Druilhe e seus colaboradores (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1990) em suas experiências de transferência passiva de anticorpos protetores.

Assim, a transferência passiva de IgG obtidos de doadores da África do Oeste a jovens tailandeses portadores de infecções clínicas por *P. falciparum* parcialmente resistentes a quinina resultaram em excelentes quedas imediatas de parasitemia, do nível de 2 a 3 logs nos 10 pacientes tratados, associada à cura de manifestações clínicas da infecção mas, em três deles, após essa etapa, verificou-se o aparecimento de uma nova infecção malárica, desta vez por *Plasmodium vivax*, que progrediu a ponto de exigir o tratamento por cloroquina.

A vigilância epidemiológica na prevalência de malária em uma localidade de PVH-Vila Candelária em que realizamos uma experiência de controle da endemia, baseada no tratamento dos portadores assintomáticos de *P. falciparum*, deu-nos na ocasião de observar fenômenos da mesma natureza que os observados por DRUILHE et al. (1998).

O número de casos clínicos da malária falciparum na localidade, após tratamento dos 21 portadores assintomáticos de *P. falciparum*, baixou para zero caso mensal, nos 10 meses que se seguiram ao tratamento, e passaram a 2,1 e 1 nos meses 11, 12 e 13, mas foi possível

demonstrar, pela análise de microsatelites que a linhagem de *P. falciparum*, nesses casos de infecção, era diferente das linhagens circulando anteriormente ao tratamento e idêntica à de uma paciente grávida, chegada á localidade no mês 10 apresentando gametócitos de *P. falciparum* no sangue e que não recebera tratamento contra os mesmos. (TADA et al, 2007, 2012)

Observou-se, entretanto, que o número de casos clínicos da malária vivax, a partir do mês 12 e durante todo ano seguinte aumentou de 53 (no ano do tratamento) para 104 no ano seguinte (TADA et al., 2007, 2012).

Ambas as observações, podem-se explicar pela eliminação de um “sinal inibitório” produzido pelos parasitos falciparum de uma infecção assintomática, depois tratada (Vila Candelária) ou quiescente, depois eliminada por anticorpos protetores (Tailândia). Uma vez eliminado o sinal inibitório, os parasitos de *P. vivax*, originários de hipnozoítos ou de infecção quiescente são livres para multiplicar-se. Obviamente isso pode implicar que anticorpos anti-CLAG9 são de curta duração que deve ser avaliado por outros estudos AKPOGHENETA et al., (2008)

Essas e outras observações indicam a existência de interações afetando a densidade de populações de parasitos de uma ou outras das espécies presentes em infecções mistas, mas até o presente não houve proposição convincente de mecanismos responsáveis por estas interações. Pode-se especular que um fator inibidor negativo produzido por uma espécie ocasionalmente dominante traria vantagem a ela para evitar competição por fatores nutritivos a serem obtidos a partir do hospedeiro, além de possíveis efeitos deletérios sobre o hospedeiro que reverteriam finalmente também contra ela.

Poderia este hipotético inibidor, ser de natureza imunológica? Isto é, envolvendo a participação do hospedeiro no processo competitivo? Os autores do trabalho em Papua New Guinea propuseram que o controle da densidade das populações seria realizado por antígenos variantes secretados por um e outro dos parasitos em contato (BRUCE & DAY, 2003).

Nossos resultados favorecem a hipótese de antígeno variante, mas não como inibidor direto do parasito. O inibidor seria hospedeiro dependente e representado pelos anticorpos elaborados por indução de um dos parasitos e capazes de inibir o outro ou a si próprio como verdadeiro anticorpo protetor.

O direcionamento do processo inibitório dependeria da cinética e da frequência das infecções alternativas ou concomitantes com o mesmo ou outro parasito. O processo de interação entre as duas populações de parasito poder-se-ia desenvolver em resumo nas seguintes etapas:

(i) na(s) primeira(s) infecções dar-se-ia a sensibilização e ativação da produção de anticorpos contra *PfCLAG9* (infecção *P. falciparum*) ou *PvCLAG7* (infecção *P. vivax*) que são proteínas ortólogas (MORENO-PEREZ et al., 2011 e estudo atual);

(ii) a maior imunogenicidade de *PfCLAG9* daria a *P. falciparum* uma vantagem seletiva para inibir parasitos de *P. vivax* oriundos de uma primo infecção ou de uma infecção secundária por recaída.

## **6. CONCLUSÕES**

---

O conjunto de observações e resultados de ensaios realizados, visando a contribuição com o estudo das funções da proteína CLAG9 de *Plasmodium falciparum* nos leva as seguintes considerações finais:

A quantificação da expressão do gene *Pfclag9* realizada por PCR em tempo real, em isolados naturais e nas linhagens de parasitos de *P. falciparum* selecionados por *panning* para obter populações homogêneas de parasitos com propriedade de citoaderência específica a um dos receptores endoteliais ICAM-1, CD36 e CSA não mostrou elevado nível de expressão do gene *Pfclag9* em nenhuma das populações isoladas ou qualquer relação quantitativa, nesse sentido, qualquer relação indireta com a citoaderência.

As sequências obtidas dos clones dos isolados dos pacientes com *P. falciparum* apresentaram uma estrutura muito conservada e semelhante na região analisada do gene *Pfclag9*.

As análises por microscopia de fluorescência revelam a existência, nos parasitos de *P. vivax* de moléculas que reagem com os anticorpos de camundongos induzidas pela imunização com peptídeos sintéticos de PfCLAG9. Após análise utilizando ferramentas da bioinformática comparativa das sequências de genes *clag* de *P. falciparum* e *P. vivax* foi proposto a hipótese de que a molécula relativa nos parasitos *vivax* é a proteína CLAG7. Esse fenômeno explicaria a reação cruzada observada em anticorpos presentes nos soros de pacientes com malária causada por *P. falciparum* e *P. vivax* em particular os portadores assintomáticos de parasitos.

A observação da reatividade cruzada dos anticorpos contra CLAG9 de *P. falciparum* e anticorpos presentes no soro de pacientes com *P. vivax*, em particular portadores assintomáticos de parasitos, sugere a hipótese de participação desses elementos da família *clag* e dos anticorpos por eles induzidos no processo de regulação das interações entre plasmódios de diferentes espécies nas infecções mistas que exigem estudos complementares para seu esclarecimento.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KKA, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, Conway DJ. Duration of naturally acquired antibody responses to blood stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect. Immun.* 2008, 76:1748-55.
- Alexander DL, Arastu-Kapur S, Dubremetz JF, Boothroyd JC. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell.* 2006, 5(7):1169-73.
- Alexandre JS, Kaewthamasorn M, Yahata K, Nakazawa S, Kaneko O. Positive selection on the *Plasmodium falciparum* *clag2* gene encoding a component of the erythrocyte-binding rhoptry protein complex. *Trop Med Health.* 2011, 39(3):77-82.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25(17):3389-402.
- Andrysiak PM, Collins WE, Campbell GH. Concentration of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes from nonhuman primate blood using Percoll gradients. *Am J Trop Med Hyg.* 1986, 35:251-254.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Strauss MS: Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Curr Protoc Mol Biol.* 1989, 2-2.
- Autino B, Corbett Y, Castelli F, Taramelli D. Pathogenesis of malaria in tissues and blood. *Mediterr. J Hematol Infect Dis.* 2012; 4(1):e2012061.
- Bannister B, Hatz C, Toovey S, Price R, Zuckerman JN. The role of standby emergency medication for falciparum malaria: current opinion. *Travel Med Infect Dis.* 2004, 2(3-4):119-26.
- Bannister, L. H. and Sherman, I. W. *Plasmodium* eLS. 2009, John Wiley & Sons.
- Bannister, LH, Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. and Mitchell, GH. Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic merozoites. *Parasitol.* 2000, 121, 273-287.
- Bannister, LH, Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. and Mitchell, G. H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today.* 2001, 16, 427-433.

- 
- Barnes DA, Thompson J, Triglia T, Day K, Kemp DJ. Mapping the genetic locus implicated in cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to melanoma cells. *Mol Biochem Parasitol.* 1994, 66(1):21-9.
- Baruch DI, Gormely JA, Ma C, Howard RJ, Pasloske BL. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93(8):3497-502.
- Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell.* 1995, 14,82(1):77-87.
- Baruch DI, Rogerson SJ, Cooke BM. Asexual blood stages of malaria antigens: cytoadherence. *Chem Immunol.* 2002, 80:144-62.
- Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW, Green JL, Holder AA, Cowman AF. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem.* 2006, 281(8):5197-208.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijine G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol.* 2004, 340(4):783-795.
- Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 1989, 341(6237):57-9.
- Besteiro S, Michelin A, Poncet J, Dubremetz JF, Lebrun M. Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathog.* 2009, 5(2).
- Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* 1990,172 (6):1633-1641.
- Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJ, Morais CG, Martins MS, Krettli AU. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19KD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg.* 2002, 66(5):461-66.

- Bruce MC & Day KP. Cross species regulation of *Plasmodium* parasitemia in semi-immune children from Papua New Guinea. *Trends in Parasitology*. 2003,19(6):271.-277.
- Bruce MC, Donnelly CA, Alpert MP, Galnsli MR, Barwell JW, Waliker D, Day KP. Cross-species interaction in malaria parasites in humans. *Science*. 2000, 287(5454):845-848.
- Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, Mamoni R, Leite JA, Rodrigues MM, Soares IS, Oliveira TR, Wunderlich G, Lacerda MV, del Portillo HA, Araújo MO, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Rénia L, Costa FT. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 2010, 15;202(4):638-47.
- Chaiyaroj SC, Coppel RL, Magowan C, Brown GV. A *Plasmodium falciparum* isolate with a chromosome 9 deletion expresses a trypsin-resistant cytoadherence molecule. *Mol Biochem Parasitol*. 1994, 67(1):21-30.
- Chakravorty SJ, Hughes KR, Craig AG. Host response to cytoadherence in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Soc Trans*. 2008, 36(Pt 2):221-8.
- Chen L, Lopatnicki S, Riglar DT, Dekiwadia C, Uboldi AD, Tham WH, O'Neill MT, Richard D, Baum J, Ralph SA, Cowman AF. An EGF-like protein forms a complex with PfRh5 and is required for invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog*. 2011, 7(9).
- Chen Q, Barragan A, Fernandez V, Sundström A, Schlichtherle M, Sahlén A, Carlson J, Datta S, Wahlgren M. Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J Exp Med*. 1998, 187(1):15-23.
- Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2000, 13(3):439-50.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987, 162(1):156-9.
- Chookajorn T, Ponsuwanna P, Cui L. Mutually exclusive var gene expression in the malaria parasite: multiple layers of regulation. *Trends Parasitol*. 2008, 24(10):455-61, Review.
- Claessens A, Yvonne Adams, Ashfaq Ghumra, Gabriella Lindergard, Caitlin C. Buchan, Cheryl Andisi, Peter C. Bull, Sachel Mok, Archana P. Gupta, Christian W. Wang, Louise Turner, Mònica Arman, Ahmed Raza, Zbynek Bozdech, and J. Alexandra Rowe, A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to

- 
- human brain endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012, 26; 109(26): E1772–E1781.
- Comeaux CA, Coleman BI, Bei AK, Whitehurst and Duraisingh MT, Functional analysis of epigenetic regulation of tandem RhopH1/clag genes reveals a role in *Plasmodium falciparum* growth. *Mol Microb* 2011, 80(2),378-390.
- Cooper JA, Ingram LT, Bushell GR, Fardoulis CA, Stenzel D, Schofield L, Saul AJ. The 140/130/105 kilodalton protein complex in the rhoptries of *Plasmodium falciparum* consists of discrete polypeptides. *Mol Biochem Parasitol*. 1988, (2-3):251-60.
- Costa FT, Lopes SC, Ferrer M, Leite JA, Martin-Jaular L, Bernabeu M, Nogueira PA, Mourão MP, Fernandez-Becerra C, Lacerda MV, del Portillo H. On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*: raison d'être? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011, 106 Suppl 1:79-84.
- Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *JCB*. 2012, 198 (6): 961-971
- Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006, 124 (4): 755-756.
- Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, Wong KT, Adem P, Zaki SR, Singh B, Krishna S., Severe malaria - a case of fatal Plasmodium knowlesi infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J*. 2010, 11; 9:10.
- Cox-Singh J, Singh B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol*. 2008, 24(9):406-10.
- Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol*. 2001, 115(2):129-43.
- Craig A. Malaria: a new gene family (clag) involved in adhesion. *Parasitol Today*. 2000, 16(9):366-7
- Craig AG, Khairul MF, Patil PR. Cytoadherence and severe malaria. *Malays J Med Sci*. 2012, 19(2):5-18.
- Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, Ndir O, Kwiatkowski DP, Duraisingh MT, Rayner JC, Wright GJ. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature*. 2011, 9;480(7378):534-7.

- 
- Cyrklaff M, Sanchez CP, Kilian N, Bisseye C, Simpore J, Frischknecht F, Lanzer M. Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Science*. 2011, 334(6060):1283-6.
- Day KP, Karamalis F, Thompson J, Barnes DA, Peterson C, Brown H, Brown GV, Kemp DJ. Genes necessary for expression of a virulence determinant and for transmission of *Plasmodium falciparum* are located on a 0.3-megabase region of chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993, 90(17):8292-6.
- de Koning-Ward TF, Gilson PR, Boddey JA, Rug M, Smith BJ, Papenfuss AT, Sanders PR, Lundie RJ, Maier AG, Cowman AF, Crabb BS. A novel protein export machine in malaria parasites. *Nature*. 2009, 459(7249):945-9.
- de Koning-Ward TF, Gilson PR. Keeping it simple: an easy method for manipulating the expression levels of malaria proteins. *Trends Parasitol*. 2009, 25(1):4-7
- Douglas AD, Williams AR, Illingworth JJ, Kamuyu G, Biswas S, Goodman AL, Wyllie DH, Crosnier C, Miura K, Wright GJ, Long CA, Osier FH, Marsh K, Turner AV, Hill AV, Draper SJ. The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nat Commun*. 2011, 20; 2:601.
- Druilhe P, Daubersies P, Patarapotikul J, Gentil C, Chene L, Chongsuphajaisiddhi T, Mellouk S, Langsley G. A primary malarial infection is composed of a very wide range of genetically diverse but related parasites. *J Clin Invest*. 1998, 101(9):2008-16.
- Duraisingh MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW, McFadden GI, Cowman AF. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J*. 2003, 22(5):1047-57.
- Eda S, Eda K, Prudhomme JG, Sherman IW. Inhibitory activity of human lactoferrin and its peptide on chondroitin sulfate A-, CD36-, and thrombospondin-mediated cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood*. 1999, 94(1):326-32.
- Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*. 1985, 55:836-39.
- Ferreira MU, Kimura EA, Katzin AM, Santos-Neto LL, Ferrari JO, Villalobos JM, de Carvalho ME. The IgG-subclass distribution of naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum*, in relation to malaria exposure and severity. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998, 92(3):245-56.

- Ferreira, MU, SOARES, IS, The merozoite surface protein-1 (MSP-1) as a human malaria vaccine candidate: Geographic patterns of allelic diversity and immune recognition. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 2000, 52: 254 – 268.
- Flick K, Scholander C, Chen Q, Fernandez V, Pouvelle B, Gysin J, Wahlgren M. Role of nonimmune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria. *Science*. 2001, 293(5537):2098-100.
- Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F, Nehrass U, Wellems TE, Scherf A. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature*. 2000, 26; 407(6807):1018-22.
- Gardiner DL, Holt DC, Thomas EA, Kemp DJ, Trenholme KR. Inhibition of *Plasmodium falciparum* *clag9* gene function by antisense RNA. *Mol Biochem Parasitol*. 2000, 110(1):33-41.
- Gardiner DL, Spielmann T, Dixon MW, Hawthorne PL, Ortega MR, Anderson KL, Skinner-Adams TS, Kemp DJ, Trenholme KR. CLAG 9 is located in the rhoptries of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*. 2004, 93(1):64-7.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002, 419(6906):498-511.
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002, 30(6):503-12.
- Goel S, Valiyaveetil M, Achur RN, Goyal A, Mattei D, Salanti A, Trenholme KR, Gardiner DL, Gowda DC. Dual stage synthesis and crucial role of cytoadherence-linked asexual gene 9 in the surface expression of malaria parasite var proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(38):16643-8.
- Gölnitz U, Albrecht L, Wunderlich G. Var transcription profiling of *Plasmodium falciparum* 3D7: assignment of cytoadherent phenotypes to dominant transcripts. *Malar J*. 2008, 14;7:14.
- Graph Pad Prism 5. 0 (GraphPad Software – San Diego, USA).

- 
- Grüring C, Heiber A, Kruse F, Ungefehr J, Gilberger TW, Spielmann T. Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nat Commun.* 2011, Jan 25;2:165.
- Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TW, Berriman M, et al. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science.* 2005, 307(5706):82-6.
- Hanssen E, Sougrat R, Frankland S, Deed S, Klonis N, Lippincott-Schwartz J, Tilley L. Electron tomography of the Maurer's cleft organelles of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes reveals novel structural features. *Mol Microbiol.* 2008b, 67(4):703-18.
- Hienne R, Ricard G, Fusaï T, Fujioka H, Pradines B, Aikawa M, Doury JC. *Plasmodium yoelii*: identification of rhoptry proteins using monoclonal antibodies. *Exp Parasitol.* 1998, 90(3):230-5.
- Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, Liolios K, Harrison T, Lopez-Estraño C, Haldar K. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science.* 2004, 10;306 (5703):1934-7.
- Hodder AN, Czabotar PE, Uboldi AD, Clarke OB, Lin CS, Healer J, Smith BJ, Cowman AF. Insights into Duffy Binding-like Domains through the Crystal Structure and Function of the Merozoite Surface Protein MSPDBL2 from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2012, 287(39):32922-39.
- Holder AA, Freeman RR. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 1982, 156(5):1528-38.
- Holder AA, Lockyer MJ, Hardy GW. A hybrid gene to express protein epitopes from both sporozoite and merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology.* 1988, 97 (Pt 3):373-82.
- Holt DC, Bourke PF, Mayo M, Kemp DJ. A high resolution map of chromosome 9 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998, 30; 97(1-2):229-33.
- Holt DC, Fischer K, Tchavtchitch M, Wilson DW, Hauquitz NE, Hawthorne PL, Gardiner DL, Trenholme KR, Kemp DJ, *Clags in Plasmodium falciparum* and others species of *Plasmodium*. *Mol & Bioch Parasitol.* 2001, 118:259-263.
- Holt DC, Gardiner, DL., Thomas EA, MayoM, Bourke PF, Sutherland CJ, Carter R, Myers G, Kemp DJ, Trenholme KR. The cytoadherence linkend asexual gene family of

---

*Plasmodium falciparum*: are there roles other than cytoadherence? *Int. J. Parasitol.* 1999, 29:939-944.

Howard RJ, Barnwell JW. Roles of surface antigens on malaria-infected red blood cells in evasion of immunity. *Contemp Top Immunobiol.* 1984, 12:127-200.

IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.) - SciToolsOligoAnalyzer 3.1

IEDB - Immune Epitope Database and Analysis Resource [Database on the internet]. National Institute of Allergy and Infectious disease - [Cited 2012, Apr 15]. Available from: [http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (<http://www.ibge.gov.br>), acessado em 19/08/2011.

Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Su XZ, Tanabe K, Torii M. Diversity and evolution of the rhoph1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008, 158(1):11-21.

Jensen AT, Magistrado P, Sharp S, Joergensen L, Lavstsen T, Chiucchiuini A, Salanti A, Vestergaard LS, Lusingu JP, Hermsen R, Sauerwein R, Christensen J, Nielsen MA, Hviid L, Sutherland C, Staalsoe T, Theander TG. *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A var genes. *J Exp Med.* 2004, 199(9):1179-90.

Kaneko O, Tsuboi T, Ling IT, Howell S, Shirano M, Tachibana M, Cao YM, Holder AA, Torii M. The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the *clag* multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001, 118(2):223-31.

Kaneko O, Yim Lim BY, Iriko H, Ling IT, Otsuki H, Grainger M, Tsuboi T, Adams JH, Mattei D, Holder AA, Torii M. Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. *Mol Biochem Parasitol.* 2005, 143(1):20-8

Kaneko O. Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the *Plasmodium* rhoptry. *Parasitol Int.* 2007, 56(4):255-62.

Karplus PA, Schulz GE. Prediction of Chain Flexibility in Proteins - A tool for the Selection of Peptide Antigens. *Naturwissenschaften.* 1985, 72:212-213.



- Kats LM, Black CG, Proellocks NI, Coppel RL. Plasmodium rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol.* 2006; 22(6):269-76.
- Katsuragawa TH, Cunha RP, de Souza DC, Gil LH, Cruz RB, Silva Ade A, Tada MS, da Silva LH. Malaria and hematological aspects among residents to be impacted by reservoirs for the Santo Antônio and Jirau Hydroelectric Power Stations, Rondônia State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2009, 25(7):1486-92.
- Katsuragawa TH, Gil LH, Tada MS, de Almeida e Silva A, Costa JD, Araújo Mda S, Escobar AL, da Silva LH. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. *PLoS One.* 2010, 5(2):e9245.
- Kemp DJ. Antigenic diversity and variation in blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Immunol Cell Biol.* 1992, 70 ( Pt 3):201-7.
- Kirkman LA, Deitsch KW. Antigenic variation and the generation of diversity in malaria parasites. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(4):456-62
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett,* 276(1-2):172-174.
- Kraemer SM, Smith JD. Evidence for the importance of genetic structuring to the structural and functional specialization of the Plasmodium falciparum var gene family. *Mol Microbiol.* 2003, 50: 1527–1538
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 1979, 65(3):418-20.
- Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome* 2006, Res 2:2.
- Lavstsen T, Turner L, Saguti F, Magistrado P, Rask TS, Jespersen JS, Wang CW, Berger SS, Baraka V, Marquard AM, Seguin-Orlando A, Willerslev E, Gilbert MT, Lusingu J, Theander TG. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012, 26;109(26):E1791-800.
- Leech JH, Barnwell JW, Miller LH, Howard RJ. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med.* 1984 Jun 1;159(6):1567-75.

- 
- Lelièvre J, Berry A, Benoit-Vical F. An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization. *Exp Parasitol*. 2005, 109(3):195-7.
- Ling IT, Florens L, Dluzewski AR, Kaneko O, Grainger M, Yim Lim BY, Tsuboi T, Hopkins JM, Johnson JR, Torii M, Bannister LH, Yates JR 3rd, Holder AA, Mattei D. The *Plasmodium falciparum* *clag9* gene encodes a rhoptry protein that is transferred to the host erythrocyte upon invasion. *Mol Microbiol*. 2004, 52(1):107-18.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta DeltaC(T)) Method. *Methods*. 2001, 25(4):402-8.
- Lobo CA, Rodriguez M, Reid M, Lustigman S. Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). *Blood*. 2003, 101(11):4628-31.
- Lustigman S, Anders RF, Brown GV, Coppel RL. A component of an antigenic rhoptry complex of *Plasmodium falciparum* is modified after merozoite invasion. *Mol Biochem Parasitol*. 1988, 30(3):217-24.
- Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat. Rev. Microbiol*. 2009 May;7(5):341-54. Review.
- Manski-Nankervis JA, Gardiner DL, Hawthorne P, Holt DC, Edwards M, Kemp DJ, Trenholme KR. The sequence of *clag9*, a subtelomeric gene of *Plasmodium falciparum* is highly conserved. *Mol Biochem Parasitol*. 2000, 111 (2):437-40.
- Marti M, Good RT, Rug M, Knuepfer E, Cowman AF. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*. 2004, 10;306(5703):1930-3.
- Mattei, D. Esquema do telômero do cromossomo 9, 2008 comunicação pessoal, Projeto em andamento.
- Mayer DC, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, Mendoza LH, Miller LH. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106(13):5348-52.
- Moll K, Ljungström I, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren M, *Methods in Malaria Research – MR4*. 2008, Fifth edition, MR4 / ATCC Manassas, Virginia.
- Moreno-Perez DA, Mongui A, Soler LN, Sanchez-Ladino M, Patarroyo MA. Identifying and characterizing a member of the RhopH1/CLAG family in *Plasmodium vivax*. *Gene*, 2011, 481: 17-23.

- Nacer A, Roux E, Pomel Scheldig-Benatar, Sakamoto H, Scherf A and Mattei D. *clag9* is not essential for PfEMP1 Surface Expression in Non-Cytoadherent *Plasmodium falciparum* Parasites with a chromosome 9 deletion. *PLoS One*. 2011, 6(12) e29039.
- Nguitragool W, Bokhari AAB, Pillai AD, Rayavara K, Sharma P, Turpin Baravind L and Desai SA. Malaria parasite *clag3* genes determine channel mediated nutrient uptake by infected red blood cells. *Cell*. 2011, 145:665-77
- Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1992, 176(4):1183-9.
- Pieroni LM, & Costa, FM. Mapa do município de Porto Velho - RO com divisões de regiões e áreas de influências de UHE - Jirau e UHE Santo Antônio, 2010, Secretaria Municipal de saúde - SEMUSA.
- Pinzón CG, Curtidor H, García J, Vanegas M, Vizcaíno C, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Sequences of the *Plasmodium falciparum* cytoadherence-linked asexual protein 9 implicated in malaria parasite invasion to erythrocytes. *Vaccine*. 2010, 28(14):2653-63.
- PlasmoDB: plasmodium genomics resource.:<http://www.plasmodb.org>
- Przyborski JM. The Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*: parasite-induced islands within an intracellular ocean. *Trends Parasitol*. 2008, 24(7):285-8.
- Qiagen. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. Real-Time PCR Brochure Sample & Assay Technologies, 2009.
- Qiagen. Fast, quantitative, real-time PCR and two-step RT-PCR using SYBR Green I. QuantiFAST™ SYBR® Gree PCR Handbook, 2007.
- Rayner JC, Galinski MR, Ingravallo P, Barnwell JW. Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97(17):9648-53.
- Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson JK, Rogerson SJ, Brown GV. The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by P. falciparum erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(9):5198-202.

---

Rey, L. Bases da Parasitologia Médica, Editora Guanabara Koogan 4ª Edição 2011.

Richard D, Mac Raild CA, Riglar DT, Cham JA, Foley M , Baum J, Ralph SA, Norton RS, Cowman AF. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the neck rhoptry protein complex define a kee step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem*. 2010, 7:285(19):14815-22.

Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, Angrisano F, Marapana DS, Rogers KL, Whitchurch CB, Beeson JG, Cowman AF, Ralph SA, Baum J. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe*. 2011, 20;9(1):9-20.

Roberts DD, Sherwood JA, Sppitalnik SL, Panton LJ, Howard RJ, Dixit V M, Frazier WA, Miller LH & Ginsburg V, Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature*. 1985, 318(6041), 64-6.

Rodriguez LE, Curtidor H, Urquiza M, Cifuentes G, Reyes C, Patarroyo ME. Intimate molecular interactions of P. falciparum merozoite proteins involved in invasion of red blood cells and their implications for vaccine design. *Chem Rev*. 2008, 108(9):3656-705.

Rowe JA, Rogerson SJ, Raza AM, Moulds, JM, Kazatckine MD, Marrs K, Newbold, CI Atkinson JP, & Miller LH Mapping of the region of complement receptor (CR) 1 required for *Plasmodium falciparum* rosetting and Demonstration of the importance of CR1 in resetting in fiel isolades. *J Immunol*. 2000,165 (11), 6341- 344

Rungruang T, Kaneko O, Murakami Y, Tsuboi T, Hamamoto H, Akimitsu N, Sekimizu K, Kinoshita T, Torii M. Erythrocyte surface glycosylphosphatidyl inositol anchored receptor for the malaria parasite. *Mol Biochem Parasitol*. 2005, 140(1):13-21.

Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. *Vaccine*. 2012, 30(11):1972-80.

Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T, Jensen AT, Sowa MP, Arnot DE, Hviid L, Theander TG. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol*. 2003, 49(1):179-91.

Sambrook J, FritshEF, Manniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989. P-18.47-18.76.

- 
- Sam-Yellowe TY, Perkins ME. Interaction of the 140/130/110 kDa rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* with the erythrocyte membrane and liposomes. *Parasitol.* 1991, 73(2):161-71.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008, 3(6):1101-8
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods.* 2000, 46(1-2): 69-81
- Senczuk AM, Reeder JC, Kosmala MM, Ho M. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin. *Blood.* 2001, 15;98(10):3132-5.
- Shirley MW, Biggs BA, Forsyth KP, Brown HJ, Thompson JK, Brown GV, Kemp DJ. Chromosome 9 from independent clones and isolates of *Plasmodium falciparum* undergoes subtelomeric deletions with similar breakpoints in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* 1990, 40(1):137-45.
- Siano JP, Grady KK, Millet P, Wick TM. Short report: *Plasmodium falciparum*: cytoadherence to alpha(v)beta3 on human microvascular endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg.* 1998, 59(1):77-9.
- Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science.* 1994 Jun 24;264(5167):1941-4.
- Sim BK, Orlandi PA, Haynes JD, Klotz FW, Carter JM, Camus D, Zegans ME, Chulay JD. Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *J Cell Biol.* 1990, 111(5 Pt 1):1877-84.
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS., et al., Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell.* 1995, 82:101-110.
- Snounou G, Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. In: *Methods in Molecular Biology.* J.P.Clapp Human Press Inc., Totowa, N.J., 1996, 50: 263-291.
- Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X, Moch JK, Tyler JS, Narum DL, Pierce SK, Boothroyd JC, Haynes JD, Miller LH. Binding of *Plasmodium* merozoite

- 
- proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011, 108(32):13275-80.
- Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Cell*. 1995, 82:89-100.
- Tada MS, Ferreira RGM, Katsuragawa TH, Dalla-Martha RC, Costa JDN, Albrecht L, Wunderlich G, Pereira da Silva LH. Asymptomatic infections by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Brazilian Amazon basin: to treat or not to treat? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012, 107(5): 621-9.
- Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Dalla Martha RC, Rodrigues JA, Costa JDN, Pepelascov RR, Katsuragawa TH, Pereira-da-Silva LH. Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I: high prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007, 102(3):263-9.
- Tham WH, Healer J, Cowman AF. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 2012, 28(1):23-30, Review.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, 22(22):4673-4680.
- Tilley L, Hanssen E. A 3D view of the host cell compartment in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Transfus Clin Biol*. 2008,15(1-2):72-81.
- Trager W & Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976, 193(4254):673-5.
- Trenholme KR, Boutlis CS, Kuns R, Lagog M, Bockarie MJ, Gatton ML, Kemp DJ, Good MF, Anstey NM, Gardiner DL. Antibody reactivity to linear epitopes of *Plasmodium falciparum* cytoadherence-linked asexual gene 9 in asymptomatic children and adults from Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 2005, 72(6):708-13.
- Trenholme KR, Gardiner DL, Holt DC, Thomas EA, Cowman AF, Kemp DJ. Clag9: A cytoadherence gene in *Plasmodium falciparum* essential for binding of parasitized erythrocytes to CD36. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000a, 97(8):4029-33.
- Trenholme KR, Gardiner DL, Thomas EA, Holt DC, Kemp DJ, Cowman AF. Malaria: A new gene family (*clag*) involved in adhesion – reply. *Parasitol Today*. 2000b, 16(9):405.

Urban BC, Mwangi T, Ross A, Kinyanjui S, Mosobo M, Kai O, Lowe B, Marsh K, Roberts DJ. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*. 2001, 98(9):2859-61.

User bulletin #2 <http://docs.appliedbiosystems.com/search>, Applied Biosystems

Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, Corcoran LM, Burkot TR, Carter R. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1987, 236(4809):1661-6.

Wellems TE, Fairhurst RM. An evolving picture of the interactions between malaria parasites and their host erythrocytes. *Cell Res*. 2012, Mar;22(3):453-6.

Wilson DW, Fowkes FJ, Gilson PR, Elliot SR, Tavul L, Michon P, Dabod E, Siba PM, Mueller I, Crabb BS, Beeson JG. Quantifying the importance of MSP1-19 as a target of growth-inhibitory and protective antibodies against *Plasmodium falciparum* in humans. *Plos One*. 2011, 6e27705-7719.

Zuccala ES, Baum J. Cytoskeletal and membrane remodelling during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Br J Haematol*. 2011, 1365-2141.







Av. Guaporé, 215, Bairro Lagoa

Porto Velho – RO. CEP.: 76812-329

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TEMA: Estudos sobre o envolvimento de *clag9* (*cytoadherence linked asexual gene*) durante a remodelação do eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* e sua participação no desenvolvimento da imunidade em malária.**

Eu, \_\_\_\_\_

- Este trabalho tem como a justificativa o Estudo sobre o envolvimento de *clag9* durante a remodelação do eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* e sua participação no desenvolvimento da imunidade em malária. Tendo como objetivos o isolamento de cepas selvagens de malária e averiguar a possibilidade de isolar cepas e quantificar a expressão do gene de interesse.
- Com a sua autorização iremos efetuar a coleta de sangue e determinar a espécie de malária, todos os exames realizados serão de graça. Este procedimento poderá resultar em algum desconforto, já que para tanto, será necessário a coleta de sangue a partir da punção venosa (15 mL de sangue), ou digital (duas gotas de sangue). No entanto também lhe trará benefícios, pois será acompanhado por uma equipe de médicos.
- A participação é voluntária. Isto quer dizer que você tem todo o direito de não participar deste estudo e retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, e isto não trará nenhum prejuízo, e que terá garantido o seu tratamento, conforme a rotina do serviço de saúde local.
- Pela participação neste estudo, você não receberá nenhum tipo de pagamento.
- Os dados informados pelo paciente serão mantidos em absoluto sigilo e os resultados obtidos neste estudo poderão ser utilizados para trabalhos científicos, visando a melhoria das condições de saúde da comunidade, e autorizo a publicação dos mesmos.
- O resultado será entregue ao paciente, e em caso positivo, o mesmo tratado e acompanhado, ou encaminhado ao serviço médico local para melhor acompanhamento.
- Entendi o que me foi explicado sobre o estudo e concordo de livre e espontânea vontade, participar como voluntário (a) deste estudo realizado no CEPEM, estou ciente que o estudo se faz necessário para avaliar as possíveis causas da doença denominada malária causada por *Plasmodium* na região endêmica de Porto Velho – Rondônia. O estudo compreenderá exame médico, exame de malária e amostras criopreservadas no biorrepositório.

(Assinatura do participante ou responsável)

\_\_\_\_\_ Data: ...../...../.....

(Responsável pelo Estudo)/ (Nome da testemunha ou responsável).



(Impressão digital)





Projeto Estudos sobre o envolvimento de *clag9*  
(*cytoadherence linked asexual gene*) durante a remodelação  
do eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* e sua  
participação no desenvolvimento da imunidade em  
malária-



### FORMULÁRIO INDIVIDUAL

#### 1-Dados pessoais:

Registro \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . \_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone p/ Contato: \_\_\_\_\_ N°. FNS: \_\_\_\_\_ .Moradia \_\_\_\_\_

Dt. Nasc.: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Grau de Instrução \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Procedência : (último local de moradia) \_\_\_\_\_ Tempo em Rondônia: \_\_\_\_\_

Tempo no endereço atual: \_\_\_\_\_ anos \_\_\_\_\_ meses

Sexo:  Fem  Masc.

Ocupação principal: \_\_\_\_\_ Ocasional \_\_\_\_\_

Renda Familiar \_\_\_\_\_; N° de Membros na família \_\_\_\_\_

Água:  Poço Amazonas  Poço artesiano  CAERD; Esgoto:  Fossa  Tratado

Tempo de permanência na área endêmica: Anos \_\_\_\_\_ Meses: \_\_\_\_\_

Histórico familiar com malária \_\_\_\_\_

Malária atual: \_\_\_\_\_

Método(s) usado p/ o diagnóstico: \_\_\_\_\_

Parasitemia: \_\_\_\_\_

Queixa Principal: \_\_\_\_\_

Há quantos dias começou a ficar doente? \_\_\_\_\_

O que você sentiu no início da doença? \_\_\_\_\_

Fez uso de medicação nos últimos dias? \_\_\_\_\_

Antimaláricos: \_\_\_\_\_; Antibióticos: \_\_\_\_\_

Chás: \_\_\_\_\_; outros: \_\_\_\_\_

Outras Informações relevantes: \_\_\_\_\_





MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

#### PARECER Nº 964/2007

**Registro CONEP: 14324** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**Registro no CEP: 49/2006**

**Processo nº 25000.167024/2007-53**

**Projeto de Pesquisa:** "Análise do envolvimento do gene *clag9* ("cytoadherence-linked asexual gene") no mecanismo de adesão em isolados de *Plasmodium falciparum* da área endêmica da Amazônia Legal."

**Pesquisador Responsável:** Dra. Joana D'Arc Neves Costa

**Instituição:** Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEN/RO

**CEP de origem:** Centro de Medicina Tropical – CEPEN/RO

**Área Temática Especial:** Cooperação estrangeira

**Patrocinador:** CAPES

#### Sumário geral do protocolo

Doenças causadas por parasitas do gênero *Plasmodium*, filo Apicomplexa, a malária atinge anualmente entre 300 e 500 milhões de pessoas com taxa de mortalidade superior a 1,5 milhões. A doença em humanos é causada por quatro espécies de *Plasmodium*, a saber *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, e *P. malariae*, e é transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*.

Os países da América do Sul mais atingidos são Brasil e Colômbia e as regiões afetadas estão associadas aos locais de agricultura e mineração na região amazônica e na floresta tropical. Epidemias de malária relacionadas a dificuldades econômicas e sociais e problemas ambientais, também contribuem para as taxas de mortalidade. O *P. falciparum* é responsável pela quase totalidade dos óbitos, principalmente no continente africano.

No Brasil, calcula-se que sejam gastos entre 100-150 milhões de dólares por ano com as perdas associadas à malária na Amazônia legal. Recentemente foi estimado que em 2002 o número de casos de infecção por *P. falciparum* a nível mundial era de 50%, superior ao informado pela OMS, verificando-se um aumento de 200% no número de casos fora da África.

O *Plasmodium* apresenta um ciclo de vida complexo que tem características gerais conservadas em todas as espécies, apresentando uma fase sexuada e uma assexuada que ocorrem no hospedeiro invertebrado e duas fases de reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado. O parasita é transmitido pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, sendo *A. darlingi* o principal vetor na região Amazônica e em menor escala, *A. aquasalis*.

Durante uma infecção por *Plasmodium*, o eritrócito sofre uma série de modificações que o transformam em curto período de tempo. No início da infecção do eritrócito, sua membrana suporta a entrada do parasita que causa uma invaginação que origina o vacúolo parasitóforo (PV), estrutura membranosa envolvendo o parasita dentro do eritrócito. Já nas etapas iniciais de desenvolvimento, o parasita secreta uma série de proteínas que vão se integrar tanto no citoesqueleto quanto na membrana celular do eritrócito.

Recentemente foi caracterizada uma seqüência pentamérica de DNA no genoma do parasita associada à exportação destas proteínas do parasita à superfície do eritrócito infectado. Esta seqüência conservada contaria com cerca de 400 putativos genes que poderiam realizar este processo. A partir da formação dos primeiros estágios intracelular (anel), o eritrócito torna-se mais esférico, e à medida que o parasita vai se

Cont. Parecer CONEP nº964/07.

desenvolvendo aumenta a viscosidade do seu citoplasma que contribui para sua deformação. Nos estágios maduros do parasito, a superfície da membrana do eritrócito sofre importantes alterações características. No caso de *P. falciparum* os eritrócitos apresentam elevações na superfície da membrana, marcada por uma estrutura elétron densa denominada “Knob”, com 25nm de comprimento e 100nm de diâmetro.

Nesta etapa de transformação do eritrócito infectado, são detectadas mudanças na composição da membrana do mesmo. Estas mudanças podem constituir possíveis sinais que levariam à fácil retirada da circulação do eritrócito infectado. No entanto, o parasito conseguiu desenvolver estratégias que podem evitar essa retirada, permitindo a persistência da infecção.

A malária, portanto, desenvolve já em nível celular uma síndrome complexa, determinada pelos fatores tanto do hospedeiro como do parasito. Dentre os fatores do parasito, que podem ser citados como fenótipo de virulência ressalta-se a capacidade de variação antigênica e citoaderência, “rosetting”, além da indução de diversas citocinas.

Este é um projeto de doutorado que se justifica pela necessidade de compreender a biologia do parasita, o seu mecanismo de adesão e o envolvimento do gene *clag9* em isolados de *Plasmodium falciparum*, bem como o seu envolvimento no processo de citoaderência, uma vez que vários questionamentos permanecem obscuros até o momento. Conseqüentemente, do ponto de vista de possíveis aplicações, pesquisas intensivas buscam compreender os mecanismos da citoaderência, para desenvolver agentes terapêuticos que obstruam estas interações.

O objetivo geral do projeto é realizar estudos moleculares destinados a avaliar a influência do gene *clag9* e de seu produto “cytoadherence-linked asexual gene” e o envolvimento com os genes *var* e seus produtos no processo de citoaderência e/ou transporte dessas moléculas em cepas isoladas de infecções ativas de *Plasmodium falciparum*.

Os objetivos específicos serão: Comparar a capacidade de isolados naturais de parasitas *P. falciparum* da região endêmica Amazônica em aderir em diferentes receptores (CHO-CD36, CHO-CSA, ICAM-1, CHO-745, CHO-VCAM) utilizando culturas primárias; Avaliar a presença de transcritos do gene *clag9* (“cytoadherence-linked asexual gene”) nos isolados estudados; Analisar e caracterizar de isolados de *P. falciparum* e construção de parasitas inativados para o gene *clag9* (mutantes) implicados na regulação da citoaderência; Identificar nos isolados mutantes outros gene(s) do cluster identificado no braço direito do cromossomo 9 que possam estar implicados em citoaderência após a deleção do cromossomo 9.

Serão selecionados indivíduos que procuram o CEPEM/RO com diagnóstico parasitológico de malária por *P. falciparum* acima de ++ (duas cruzes) e apresentando diferentes níveis de parasitemia e de gravidade de sintomas clínicos. Serão excluídos gestantes, pessoas em uso de antimaláricos nos 15 dias anteriores e/ou com outras patologias que impeçam o cumprimento dos protocolos estabelecidos.

O diagnóstico realizar-se-á por meio do exame de gota espessa, esfregaço corado pelo Giemsa, (OMS, 1991) e diagnóstico por meio da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) baseado no protocolo de Snounou modificado.

Será coletada uma amostra de 10 ml de sangue venoso com heparina para a realização dos exames tipagem sanguínea e outros exames quando necessário.

### Local de Realização

Os estudos clínicos serão realizados no Ambulatório de Malária do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) da Secretaria de Estado da Saúde de Porto Velho/RO. Os estudos celulares “in vitro” e estudos moleculares preliminares, serão realizados no Laboratório de Epidemiologia molecular de parasitas no Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais (IPEPATRO)/RO e os estudos moleculares detalhados para definir funções do gene *clag* serão realizados no Laboratório de Relations Hote Parasite do Institut Pasteur de Paris na França.



Cont. Parecer CONEP nº964/07.

### **Apresentação do Protocolo**

Os currículos dos pesquisadores envolvidos os qualificam para a execução do estudo.

No orçamento financeiro apresentado, consta o total de R\$50.000,00 e encontra-se uma carta encaminhada ao Presidente da CAPES, solicitando uma concessão de bolsa sanduíche por um ano a um ano e meio, a partir de janeiro ou fevereiro de 2008.

Consta um Formulário Clínico Individual que será utilizado no decorrer do estudo.

### **Comentários/Considerações**

O Protocolo apresentado é parte da tese de doutorado de Joana D'Arc Neves Costa, orientado pelo Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva, será realizado na forma de projeto sanduíche com bolsa da CAPES e a colaboração do Instituto Pasteur em Paris/França.

O estudo envolve a coleta de sangue de seres humanos e possui colaboradores físicos e jurídicos estrangeiros. Parte do estudo será realizada no Instituto Pasteur de Paris, o que caracteriza o projeto como Cooperação estrangeira, porém, somente clones dos parasitos *P. falciparum* isolados dos indivíduos que tiveram malária diagnosticada, serão enviadas a França para serem parcialmente seqüenciados, manipulados geneticamente na possibilidade de identificação de nova conduta terapêutica para a malária.

Os riscos a que os sujeitos da pesquisa serão submetidos serão os mesmos a que os indivíduos que procuram o serviço médico de Porto Velho/RO com sintomas de malária, ou seja, coleta de sangue para o diagnóstico.

Os benefícios em participar da pesquisa são indiretos. Não há comprovação científica de que a análise do gene *clag9* poderá trazer benefícios ao tratamento ou prevenção da doença.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado possui linguagem acessível e esclarecedora e o conteúdo atende aos requisitos previstos na Resolução CNS 196/1996.

### **Recomendações**

1. Pede-se esclarecer se haverá participação de população indígena.
2. Apresenta uma Carta de aceitação da estudante de doutorado emitida pelo Instituto Pasteur, em francês. Pede-se apresentação da carta traduzida para o português.

**Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima e encaminhar à CONEP as recomendações cumpridas antes do início do estudo.**

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

Brasília, 13 de dezembro de 2007.

  
**Gyselle Saddi Tannous**  
Coordenadora da CONEP/CNS/MS







Governo do Estado de Rondônia  
 Secretaria de Estado da Saúde de Rondônia  
 Centro de Pesquisa em Medicina Tropical  
 Comitê de Ética em Pesquisa do CEPEM

REF.: Parecer 20/CEP/CEPEM  
 Registro no CEP/070 /08  
 Sr. Pesquisador

Porto Velho 20 de Julho de 2009

Em sua oitava reunião realizada no dia 08 de Agosto p.p., a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação analisou o protocolo com modificações envolvendo outras localidades Cachoeira do Teotônio, Nova Engenho Velho, São Sebastião, Vila Candelária, Bate Estaca, Santo Antônio, Jaci Paraná e Mutum Paraná – no município de Porto Velho, sob parecer 19/CEP/2008, intitulado: **"Efeito do tratamento de portadores de infecção assintomático por plasmódio na incidência de malária em população ribeirinha de Porto Velho - Rondônia"**.

Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou o protocolo de doutorado com modificações Aprovado.

Esclareço a V.Sa. que qualquer alteração deverá ser comunicada e que dentro de doze meses, o relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

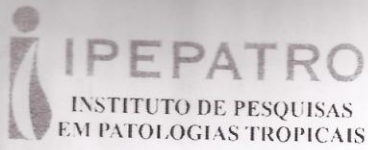
Atenciosamente.

Joana D. A. Neves Costa.  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo Sr.  
 MSc Tony Hiroshi Katsuragawa.  
 Lab. Epidemiologia

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical/CEPEM Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP





INSTITUTO DE PESQUISAS  
EM PATOLOGIAS TROPICAIS

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 78912-000, Porto Velho, RO, Brazil  
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo projeto 2009/2 registrado sob no 2009/2 na folha 5 do livro I da Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), sob a responsabilidade da Ms. Joana D'Arc Neves coordenadora do projeto intitulado "Análise do envolvimento do gene clag-9 ("cytoadherence-linked asexual gene") no mecanismo de adesão em isolados de *Plasmodium falciparum* da área endêmica de Porto-Velho-Rondônia", está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), em 12 de abril de 2010.

Porto velho, 12 de abril de 2010.

Relatores:

- Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA IPEPATRO)

- Dra. Izaltina Silva Jardim

- Ms. Luiz Herman Soares Gil



Avaliação das sequências dos três clones do isolado do paciente P59 da região do exon 9 do gene *Pflag 9* em nucleotídeos

```

PFI1730w      GTCATGGTTTGTCCCTTTTCGTTTTTTACATTTGGTATGATGAAAGCATACGCTTATTTTG 5460
SeqIII       --CATGGTTTGTCCCTTTTCGTTTTTTACATTTGGTATGATGAAAGCATACGCTTATTTTG 58
Seq1/P59CD36 -----CTTATTTTG 9
Seq2         -----CTTATTTTG 9
Seqc         -----CTTATTTTG 9
Seq2/P59Ese1 -----CTTATTTTG 9
Seq3/P59Ese1 -----CTTATTTTG 9
Seq1/P59Ese1 -----CTTATTTTG 9
Seq3/P59VCAM -----CTTATTTTG 9
Seq2/P59VCAM -----CTTATTTTG 9
Seq1/P59VCAM -----CTTATTTTG 9
Seq3/P59ICAM-1 -----CTTATTTTG 9
Seq2/P59ICAM-1 -----CTTATTTTG 9
Seq1/P59ICAM-1 -----CTTATTTTG 9
Seq/         -----CTTATTTTG 9
Seq2/       -----CTTATTTTG 9
Seq1/P59C8A -----CTTATTTTG 9
*****
PFI1730w      AAAATGTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 5520
Seq1SeqIII   AAAATGTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 118
Seq1/P59CD36 AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq2         AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seqc         AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq2/P59Ese1 AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq3/P59Ese1 AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq1/P59Ese1 AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq3/P59VCAM AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq2/P59VCAM AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq1/P59VCAM AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq3/P59ICAM-1 AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq2/P59ICAM-1 AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq1/P59ICAM-1 AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq/         AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq2/       AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
Seq1/P59C8A AAA--GTTATATTTTCTTGAGAAACTCTATCCGTATTTTGGATGAGATTTTATTC AATAT 67
*** *****
PFI1730w      TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 5580
SeqIII       TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 178
Seq1/P59CD36 TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq2         TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seqc         TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq2/P59Ese1 TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq3/P59Ese1 TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq1/P59Ese1 TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq3/P59VCAM TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq2/P59VCAM TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq1/P59VCAM TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq3/P59ICAM-1 TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq2/P59ICAM-1 TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq1/P59ICAM-1 TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq/         TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq2/       TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
Seq1/P59C8A TAGAAAATTTATGTTGTCATGTACATTTAAAAGATTATTC AATAAAATGACAGTTGATAAAAT 127
*****
PFI1730w      TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAG 5640
SeqIII       TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAG 238
Seq1/P59CD36 TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq2         TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seqc         TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq2/P59Ese1 TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq3/P59Ese1 TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq1/P59Ese1 TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq3/P59VCAM TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq2/P59VCAM TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq1/P59VCAM TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq3/P59ICAM-1 TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq2/P59ICAM-1 TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq1/P59ICAM-1 TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq/         TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq2/       TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
Seq1/P59C8A TACTCAAGGCTATGTCAAGAGCTTATACATCTACTAAAAAGGAAGGTGCTTACG AAGAAGCAA 190
*****

```





Análise das sequências em aminoácidos da região do exon 9 do gene *Pfclag 9* dos isolados dos pacientes P59, P1, P2, P3, P5, P54, P57, P65 e cepas de referência 3D7, Dd2 e W2 de *P. falciparum*

```

SeqDd2ICAM      LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqDd2E-Se1    LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqDd2CD36     LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqDd2CSA      LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
W2             LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqDd2         LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P57           LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P65           LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59E-Se1   LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59VCAM    LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59CSA     LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59ICAM    LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59        LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP59CD36    LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP2E-Se1    LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P54           LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP2ICAM     LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP2VCAM     LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP2CD36     LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP2CSA      LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP1VCAM     LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP2V        LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP1ICAM     LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP1E-Se1    LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqDd2VCAM    LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP1CSA      LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP1CD36     LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP1B        LILNVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3         LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3CD36     LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3CSA      LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3VCAM     LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P5            LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P5CD36        LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P5CSA         LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P5ICAM        LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P5ESe1        LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P5VCAM        LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3ICAM     LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
SeqP3E        LILSVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
Seq3D7        LILKVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
Seq3D7CD36    LILKVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
Seq3D7CSA     LILKVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
Seq3D7ICAM    LILKVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
Seq3D7VCAM    LILKVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
PF1730w       YFENVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
3D7           YFENVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
P65C          YFENVIFFFLNSIRIFDRFYSILENYVCMYIKRFLFNKLTVDKLLKAMSRAYTSTKKEGAYEEA 63
: .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```





## Cross-reactive anti-PfCLAG9 antibodies in the sera of asymptomatic parasite carriers of *Plasmodium vivax*

Joana D'Arc Neves Costa<sup>1,3/+</sup>, Fernando Berton Zanchi<sup>2</sup>,  
Francisco Lurdevanhe da Silva Rodrigues<sup>1</sup>, Eduardo Rezende Honda<sup>1</sup>, Tony Hiroschi Katsuragawa<sup>2</sup>,  
Dhélío Batista Pereira<sup>1,3</sup>, Roger Lafontaine Mesquita Taborda<sup>1</sup>, Mauro Shugiro Tada<sup>1,2</sup>,  
Ricardo de Godoi Mattos Ferreira<sup>2</sup>, Luiz Hildebrando Pereira-da-Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, RO, Brasil <sup>2</sup>Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais-Fiocruz, Porto Velho, RO, Brasil <sup>3</sup>Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brasil

*The PfCLAG9 has been extensively studied because their immunogenicity. Thereby, the gene product is important for therapeutics interventions and a potential vaccine candidate. Antibodies against synthetic peptides corresponding to selected sequences of the Plasmodium falciparum antigen PfCLAG9 were found in sera of falciparum malaria patients from Rondônia, in the Brazilian Amazon. Much higher antibody titres were found in semi-immune and immune asymptomatic parasite carriers than in subjects suffering clinical infections, corroborating original findings in Papua Guinea. However, sera of Plasmodium vivax patients from the same Amazon area, in particular from asymptomatic vivax parasite carriers, reacted strongly with the same peptides. Bioinformatic analyses revealed regions of similarity between P. falciparum Pfclag9 and the P. vivax ortholog Pvclag7. Indirect fluorescent microscopy analysis showed that antibodies against PfCLAG9 peptides elicited in BALB/c mice react with human red blood cells (RBCs) infected with both P. falciparum and P. vivax parasites. The patterns of reactivity on the surface of the parasitised RBCs are very similar. The present observations support previous findings that PfCLAG9 may be a target of protective immune responses and raises the possibility that the cross reactive antibodies to PvCLAG7 in mixed infections play a role in regulate the fate of Plasmodium mixed infections.*

Key words: malaria - immunity - Amazon - cross-reaction

The cytoadherence-linked asexual gene (*clag*) was initially identified in parasite lines with a deletion in chromosome 9 (Shirley et al. 1990) that lost the ability of binding to C32 melanoma cells bearing surface CD36 (Trenholme et al. 2000). Further sequencing of *Plasmodium falciparum* genome (Gardner et al. 2002), established that the chromosome 9 deletion (D10 deletion) affected a subtelomeric region containing 20 coding sequences. Additional experiments led to the identification of the gene encoding the CLAG protein containing nine exons (Holt et al. 1998, Gardiner et al. 2000). At the same time, a family of *clag* genes homologous to *Pfclag9* was described (Holt et al. 2001). *Clag* family members were found on chromosome 2 (*clag2*), 3 (*clag3.1* and *clag3.2*) and 8 (*clag8*). To date, three CLAG proteins were located in the rhoptries and they were associated to the high molecular weight protein complex of the RhopH family (Kaneko et al. 2001, Gardiner et al. 2004).

More recently, the functional and structural roles of other components of the *clag* gene family have been elucidated. The PfRhopH complex containing CLAG

proteins is composed of three subunits named RhopH1, RhopH2 and RhopH3 (Kaneko et al. 2005). In the mature schizont, the subunits are localised in the merozoites' rhoptries, whose contents are discharged at the moment of contact with the erythrocyte membrane, concomitantly with the formation of the moving junction and the parasitophorous vacuole (PV). The three protein known, components of the PfRhopH1 subunit (CLAG2, CLAG3.1 and CLAG9), are then discharged into the PV (Ling et al. 2004, Kaneko 2007, Iriko et al. 2008).

The rhoptry neck protein 2 is associated in erythrocyte invasion (Cao et al. 2009). It is expressed in the apical portion of the rhoptry in association with the RHopH1 complex that includes CLAG9. It is known that *Plasmodium* proteins can be exported to the host cell cytosol (Richard et al. 2010) via the translocon export complex of proteins that include the CLAG family. Thus merozoites can secrete directly products from the apical organelles into the PV and enter the PV membrane, or via the *Plasmodium* export element (de Koning-Ward et al. 2009, Mayer et al. 2009) they reach the erythrocyte plasma membrane. Therefore, the RhopH/CLAG complex discharged by the merozoites will participate in remodelling the infected red blood cells (RBCs).

Recent genetic experiments (Nguitragool et al. 2011) using clones obtained from the cross of HB3 and Dd2 *P. falciparum* strains showed that PfCLAG3 participates in the Plasmodial Surface Anion Channel formation. In addition, the traffic of PfCLAG3 after its injection into the cytosol and entry into the PV membrane (PVM) has

Financial support: CNPq (Malaria Research), FINEP, MS/DECIT

+ Corresponding author: joanadarcneves@hotmail.com

Received 23 July 2012

Accepted 31 October 2012

been followed up to its final destination in the infected erythrocyte membrane. Goel et al. (2010) proposed that the exported PfCLAG9 also traffics to the erythrocyte membrane PfCSA variant antigen.

On the other hand, in recent studies, surprising conclusion concerning the functional role of CLAG9 has been reached (Nacer et al. 2011). In convincing detailed experiments using atomic force microscopy and knockout disruption of the *Pfclag9* gene, it was shown that CLAG9 does not contribute to cytoadherence to CD36. Thus the non-adherent phenotype in the original D10 deletion of chromosome 9 (Shirley et al. 1990) must be dependent on another gene(s) encoded in the D10 deletion (Nacer et al. 2011). The authors conclude that CLAG9 function, like that of CLAG3 (Nguitrangolo et al. 2011), is associated with the metabolic requirements of the parasite.

Considering the important roles of the proteins encoded by the *clag* gene family in the life cycle of *P. falciparum* at the asexual blood stages, including the erythrocyte invasion step, the participation of PfCLAG9 in the development of immunity to falciparum malaria was investigated in Papua New Guinea. A direct correlation with high antibodies titres against peptides representing linear epitopes of PfCLAG9 and immunity in semi-immune children and adults was found (Trenholme et al. 2005). In the present study we prepared synthetic peptides corresponding to different segments of PfCLAG9 and analysed their antigenicity in individuals from the Brazilian Amazon infected with falciparum or vivax parasites. Two groups were analysed: (i) individuals presenting clinical symptoms and (ii) asymptomatic parasite carriers.

#### SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

**Study site and population** - The study was performed with patients from suburban and rural riverside areas of the Rio Madeira in Porto Velho, capital of the state of Rondônia (RO), an area with a high incidence of malaria located in the Brazilian Amazon.

The population presents a profile of several previous episodes of malaria, as described (Tada et al. 2007). This characteristic of the population due to a high density of the *Anopheles darlingi* vector (Gil et al. 2003, 2007). Annual parasite index levels found for residents of these localities were 200-800, in association with the development of natural immunity among long time residents and a prevalence of asymptomatic malaria parasite carriers in the adult population varying from 15-30% for *Plasmodium vivax* and 5-10% for *P. falciparum* (Katsuragawa et al. 2009, 2010). Control measures developed in recent years, based on new formulations of drugs against *P. falciparum* malaria, have reduced the risk of *P. falciparum* infections in the studied areas to less than 10% (Epidemiologic Surveillance of Information System/Brazilian Health Ministry) ([portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/default.asp](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp)). The county of Porto Velho still accounts for 10% of the total *P. vivax* and *P. falciparum* malaria cases in Brazil.

**Diagnostic, sera collection and processing** - Sample collection of parasites, as well as blood sample collection and processing, have been previously described (Tada et al. 2007). Malaria infection diagnostic proce-

dures were performed by microscopy examination and nested polymerase chain reaction (PCR) methods. The protocol used was based in Snounou (1996) and used genus-specific (rPLUS5 and rPLUS6) and species-specific (rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rVIV1 and rVIV2) primers. Briefly, the 20 µL of reaction volume per tube consisted of 250 nm of each primer, 125 µM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCL, 10 mM Tris pH 8.3, 0.4U Taq polymerase (Invitrogen) and 1 µL of genomic DNA. In the first PCR, the samples were subjected to initial denaturation at 95°C for 5 min, a step at 58°C for 2 min, a step at 72°C for 2 min that was followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 2 min, 72°C for 2 min and a final step at 72°C for 5 min in Gene Amp® PCR System 9700.

The second reaction was performed with 35 amplification cycles. All PCR assays included positive control (*P. vivax*, *P. falciparum*) and negative controls (ultrapure water). The fragments were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in tri-borate-ethylenediamine tetraacetic acid buffer and were visualised with ethidium bromide (Invitrogen) or Blue Green (LCG Biotechnologies, Brazil) under ultraviolet light. Asymptomatic malaria parasite carriers were defined by PCR detection of parasites in the absence of clinical symptoms and signs of malaria in the 30 days of surveillance following the positive examination.

**Human serum samples** - Serum samples were obtained from two groups of malaria patients: (i) Those who actively sought malaria treatment and who showed symptoms of acute malaria and positive blood smears for *P. falciparum* or *P. vivax*. These sera were collected between 2006-2008 in the Malaria Post of the Centre for Research in Tropical Medicine (CEPEM). (ii) Another group of sera was obtained from asymptomatic individuals patients living in the malaria endemic localities in the suburban and rural localities of Vila Candelária, Cachoeira do Teotônio, Santo Antônio and Vila Amazonas of Porto Velho (Tada et al. 2012). Asymptomatic sera were thus classified as those from individuals in the same localities, with positive PCR for *P. vivax* and/or *P. falciparum* and without recorded clinical symptoms for at least 30 days period after the positive PCR diagnosis.

**CLAG9 peptides** - The selection of synthetic peptides representing possible epitopes of CLAG9 (GenBank 167963009) ([ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) was based the following programs: Flexibility Prediction (Karplus & Schulz, 1985), Hydrophilicity Prediction (Parker et al. 1986), Antigenic Propensity (Kolaskar & Tongaonkar 1990), Bepipred Linear Epitope Prediction (Larsen et al. 2006) and Surface Accessibility Prediction (Emini et al. 1985). Calculations in each method were made using the software Antibody Epitope Prediction available from the Immune Epitope Database ([immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)). The three selected peptides derived from PfCLAG9 were named A, B and C (Fig. 1) and were synthesised at GenScript (Piscataway, NJ, USA). The comparison between PfCLAG9 and PvCLAG7 (GenBank 156081674) and PvCLAG8 (GenBank 156096581) proteins was done using the CLUSTALW software (Thompson et al. 1994).



**Antibody reactivity to synthetic peptides in sera of malaria patients** - All serum samples from malaria patients as well as negative controls were tested in duplicate by the enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) as described by Braga et al. (2002). This test was performed thrice. The cut-off value was defined as the mean plus two standard deviations of the absorbance values obtained with 64 negative control sera from malaria-naïve blood donors living in Porto Velho and São Paulo. The cut-off absorbance values used to define positive results were 0.216, 0.226 and 0.236 for peptides A, B and C, respectively. The results were expressed as reactivity index (RI) defined by optical density (OD)<sub>450nm</sub> values of tested samples divided by the value of the cut-off. Values of RI > 1.0 were considered positive.

**Immunisation of BALB/c mice with synthetic PfCLAG9 peptides** - Female BALB/c mice (4-6 weeks old) were immunised intramuscularly with three doses of 50 µg of peptide for each synthetic peptides A, B and C (5 mice per group). The first dose of peptide was emulsified in Freud's complete adjuvant (Sigma) and the two subsequent peptide boosters 20 and 40 days later were emulsified in Freud's incomplete adjuvant (Sigma). Sera were collected prior to the first immunisation and 20 days after administering the last booster dose. The sera of each group of mice were pooled and stored at minus 20°C until use.

**Parasitised RBCs (PRBCs) preparation and immunofluorescence antibody test (IFAT) - *P. falciparum* 3D7** (Walliker et al. 1987) PRBC were obtained from parasite cultures as described by Trager and Jensen (1976). Parasite cultures were synchronised by sorbitol lysis (Lambros & Vanderberg 1979) and trophozoites and schizonts obtained as in Lelievre et al. (2005). For *P. vivax* infected RBCs isolation, peripheral blood samples from donor's patients with *P. vivax* malaria were collected into 20 mL of heparinised containing vacutainer tubes. PRBCs in stage of trophozoites and schizonts were concentrated using a discontinuous Percoll gradient (GE Healthcare) (Andrysiak et al. 1986). Thin smears were prepared and placed on multisport slides at room temperature and stored at -80°C. Slides were fixed with formaldehyde for 2 min, washed twice with phosphate buffered saline (PBS) according to a previously established protocol (Nacer et al. 2011). Slides were incubated in humid chamber for 1 h at 37°C with primary antibody (mouse anti-peptides A, B, C and negative control - polyclonal

antibodies) diluted to 1:40 in blocking buffer (0,5% gelatin, 1,5% bovine serum albumin, 0,02% Tween 20 in PBS). Sequentially, slides were washed three times with PBS and incubated with goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (1:600) (Life Technologies) 45 min. Nuclei was stained with 0.2 mg/mL 4'6-diamidino-2-phenylidole (Sigma) for 5 min and finally mounted and examined using fluorescent microscope (Nikon eclipse 80i).

**Statistical analysis** - Statistical analysis was evaluated using GraphPad Prism 5 for Windows®. All comparisons were between groups defined as asymptomatic and symptomatic malaria parasite carriers. For quantitative data, the non-parametric data, the Mann-Whitney *U* test was applied (RI comparisons considering only positive values). For qualitative data (positive and negative sera) Fisher's exact test applied. Confidence intervals of 95% were also calculated.

**Ethical statements** - The research protocols for human subjects were approved by the Ethical Research Committee (CEP) of the CEPÉM in accordance with ethical principles of conduct. Blood samples of individuals in the study population were collected after informed consent and written agreement of each individual of the population sample (CEP-CEPEM decision 25/2004, Candelária; 49/2006, Porto Velho CEPÉM; 70/2008, Sector - Santo Antônio - Teotônio, Cachoeira do Teotônio - Santo Antônio). All procedures for mice immunisation and preparation of anti-PfCLAG9 antigens sera were evaluated and approved by the Ethical Committee on Animal Use of the Research Institute of Tropical Pathology-Oswaldo Cruz Foundation (2009/2).

## RESULTS

**Antibodies against PfCLAG9 A, B and C peptides present in malaria patients** - The first ELISA test were performed in sera of falciparum malaria patients (n = 115), independent of or not with clinical symptoms at the time of blood sampling. As negative controls (n = 64) and sera from vivax malaria patients (n = 139). Surprisingly, positive values were obtained in the sera of vivax patients, with stronger signals in asymptomatic parasite carriers (Table).

The results presented in Table confirm previous observations with *P. falciparum* patients in Papua New Guinea (Trenholme et al. 2005), showing higher ELISA RI values for peptides A, B and C in asymptomatic carriers than in patients with clinical symptoms. However,

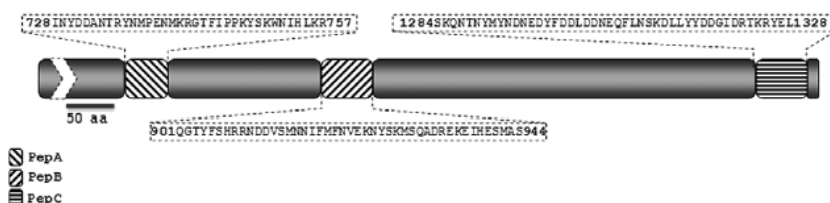


Fig. 1: localization of the three synthetic peptide (Pep) in PfCLAG9 protein. Peptide A reproduces the 32 amino acid sequence from the residue 728-760, peptide B reproduces the 43 amino acid (aa) sequence from residue 901-944 and peptide C reproduces the 56 amino acid sequence from the residue 1284-1340.

a high proportion of sera from *P. vivax* patients also recognised the A, B and C peptides of PfCLAG9 and the intensity of the responses correlated with clinical immunity to vivax infections.

Nevertheless, positive values were found in 90-100% of all *P. falciparum* patient samples, while the frequency was 40-60% of symptomatic *P. vivax* patients and 80-90% of asymptomatic subjects. When considering only the reactive sera among clinical patients samples, the average RI value observed was two-three fold higher in *P. falciparum* than in *P. vivax* patients. However, for asymptomatic carriers of both parasite species the observed RI values were equivalent (Table).

*Antibodies against merozoite surface protein (MSP)1-19 antigens of P. falciparum or P. vivax origin in sera of symptomatic and asymptomatic vivax malaria patients* - Our results suggest that some symptomatic or asymptomatic *P. vivax* patients had been previously exposed to *P. falciparum* infections. To study this possibility we tested

all sera against recombinant MSP1-19 antigens of *P. vivax* and of *P. falciparum* origin (PvMSP1-19 and PfMSP1-19).

Fig. 2 and Table compare ELISA titres performed with PfCLAG peptides A, B and C and those with those using PfMSP1-19 and PvMSP1-19 antigens. The selected samples corresponded to sera from patients with positive PCR for *P. vivax* and negative PCR for *P. falciparum* and with antibody reactivity with at least one of the PfCLAG9 peptides. Only 9 (15.2%) out of 59 sera from asymptomatic patients reacted against the heterologous PfMSP1-19, indicating that the large majority of these patients had not been recently exposed to *P. falciparum* infections. Among patients with clinical symptoms, only 16 (28.6%) out of 59 sera from *P. vivax* patients presented reactivity against PfMSP1-19 antigen while 100% reacted against the homologous PvMSP1-19.

*Molecular basis of the cross reactivity* - In order to understand the molecular basis for the observed CLAG9 cross reactivity we investigated possible sequence iden-

TABLE  
Enzyme-linked-immunosorbent-assay test comparing sera reactivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* clinical patients and asymptomatic (Asymp) parasite carriers against PfCLAG9 peptides A, B and C

Non parametric Mann-Whitney test		<i>P. falciparum</i>					<i>P. vivax</i>				
Peptides PfCLAG9	Group	n	Mean	95% CI		p	n	Mean	95% CI		p
				Lower	Upper				Lower	Upper	
A	Symp	42	5.494	4.630	6.357	0.0004	33	1.978	1.527	2.430	0.0001
	Asymp	64	3.747	3.101	4.392		52	3.872	3.368	4.375	
	Total	106	4.439	3.903	4.975		85	3.137	2.735	3.538	
B	Symp	41	6.055	4.982	7.128	0.0094	46	1.963	1.672	2.255	0.0001
	Asymp	68	7.940	7.052	8.829		56	5.745	4.647	6.842	
	Total	109	7.231	6.534	7.928		102	4.039	3.327	4.752	
C	Symp	44	2.667	2.165	3.169	0.0141	32	1.384	1.154	1.614	0.0001
	Asymp	66	3.718	3.113	4.324		57	2.687	2.276	3.099	
	Total	110	3.298	2.877	3.729		89	2.219	1.916	2.522	
PfMSP1-19	Symp	-	-	-	-	-	16	2.598	1.819	3.376	0.0579
	Asymp	-	-	-	-	-	9	3.604	2.957	4.252	
	Total	-	-	-	-	-	25	2.96	2.404	3.516	
PvMSP1-19	Symp	17	2.287	1.586	2.988	0.1361	56	3.068	2.591	3.545	0.2513
	Asymp	29	2.767	2.271	3.262		59	2.556	2.231	2.880	
	Total	46	2.589	2.194	2.985		115	2.805	2.520	3.090	

the p values shown are from the non-parametric Mann-Whitney *U* test. Only positive (reactivity index  $\geq 1$ ) results were considered for descriptive and tests statistics. CI: confidence interval; MSP1-19: merozoite surface protein of *P. falciparum*; PvMSP1-19: MSP of *P. vivax*; Symp: symptomatic.

tities and similarities between PfCLAG9 synthetic peptides A, B and C and the *P. vivax* CLAG orthologs encoded on chromosomes 7, PvCLAG7 (Moreno-Perez et al. 2011) and 8, PvCLAG8 (Carlton et al. 2008). The other hypothetical genes deposited, such as PvCLAG14, showed no significant similarities for comparison.

As shown in Fig. 3A, significant similarity (84.44%) and identity (64.4%) was observed between peptide B (PfCLAG9 - residues 901-944) with amino acids residues 888-932 of PvCLAG7. Peptide B presents also significant similarity (86.66%) and identity (55.6%) with *P. vivax* CLAG 8, but the similarity amino acids are found at a slightly shifted position (897-941) of PvCLAG8 (Fig. 3B). In addition, a lower but still significant degree of similarity was observed for peptides A and peptide C (Fig. 3A, B).

The highest identity/similarity observed with peptide B (residues 901-944 of PfCLAG9 and residue 888-932 of PvCLAG7) coincided with the highest ELISA RI values, or 7.9 and 6.0 for *P. falciparum* asymptomatic and symptomatic infections, respectively and 5.7 and 1.9 for *P. vivax*. Similar pattern was shown for peptide A (Table).

These results show that cross reactivity is likely due to similarity between the CLAG proteins of both parasite species, supporting the notion that PvCLAG7 and PvCLAG8 are orthologs of PfCLAG9.

Cross reactive antibodies recognise epitopes in RBCs infected by *P. falciparum* or *P. vivax*. Fig. 4 represents the result of indirect immunofluorescence assays of trophozoite and schizonts stages of *P. vivax* and *P. falciparum* using mouse antibodies to synthetic peptide B of PfCLAG9 antigen. As shown, the pattern of parasites labelling in the PRBCs is very similar. Comparable profiles were observed in schizonts incubated with antisera to PfCLAG A, PfCLAG B and PfCLAG C (data not shown). No positive labelling was observed in ring stages.

DISCUSSION

Results in the present study show that antibodies with high reactivity to PfCLAG9 are found in asymptomatic *P. falciparum* parasite carriers patients correlating with clinical immunity and supporting previous epidemiological observations in Papua New Guinea (Trenholme et al. 2005). Interestingly, high reactive

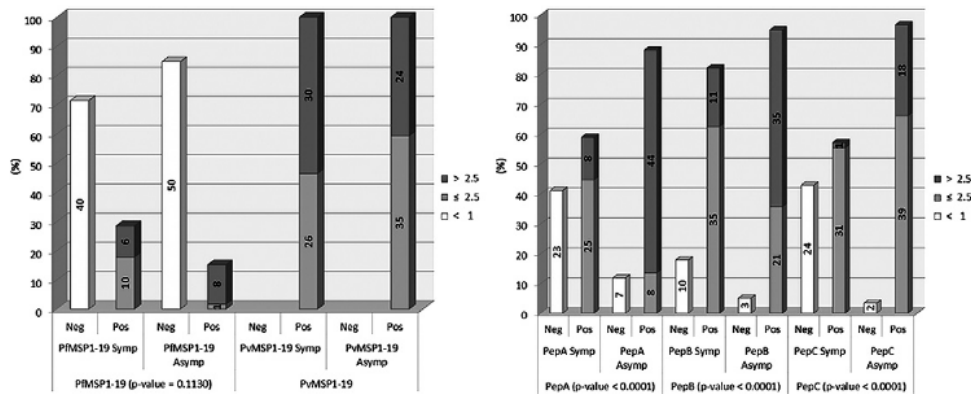


Fig. 2: comparison of frequency and antibody serum samples levels of each recombinant protein merozoite surface protein (MSP)1-19 of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antigens carries positive PfCLAG9 with *P. vivax* asymptomatic (Asymp) and symptomatic (Symp). Negative (Neg) [reactivity index (RI) < 1] and positive (Pos) (RI ≥ 1) sera counts where done using Fisher's exact test.

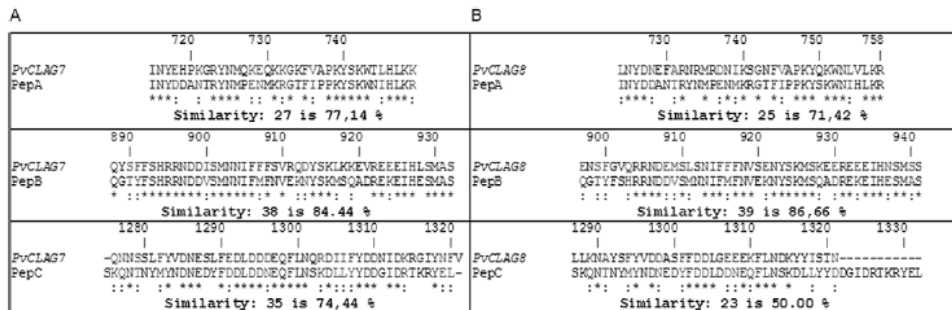


Fig. 3: sequence similarity between synthetic PfCLAG9 peptides A, B and C with the corresponding regions of PvCLAG7 encoded on chromosome 7 (A) and CLAG8 encoded on chromosome 8 (B).



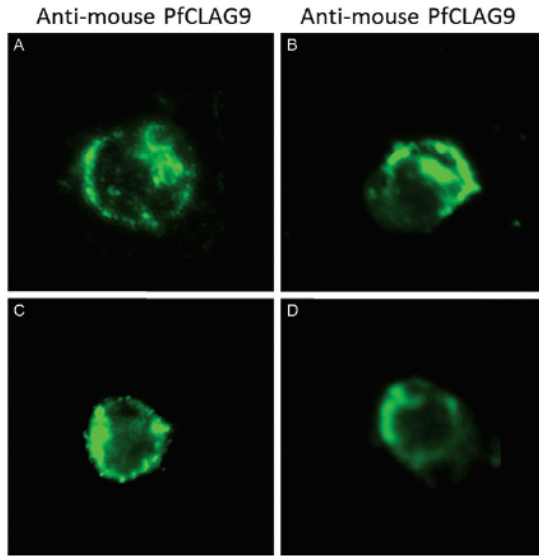


Fig. 4: indirect immunofluorescence pattern of mouse polyclonal anti-serum against synthetic peptides of PfCLAG9 in parasitised red blood cells (PRBC) with schizonts of *Plasmodium vivax* (A) and *Plasmodium falciparum* (B) and in PRBC with trophozoites of *P. vivax* (C) and *P. falciparum* (D), respectively, by goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488.

cross-reactive antibodies against PfCLAG9 peptides were also found in sera of asymptomatic *P. vivax* malaria parasite carriers patients and this is the main focus of the discussion.

The first point to consider is if the observed cross reactivity of antibodies corresponds to some immunophysiological process, it could be related to interactions between malaria parasites in the vertebrate host. Previous studies with semi-immune children in Papua Guinea, harbouring mixed infections by both *Plasmodium* species, have shown that parasite density of *Plasmodium* species in mixed infections oscillates around a threshold and that peaks of infection with each species do not coincide (Bruce et al. 2000, Bruce & Day 2003). The authors proposed that malaria parasitaemia is controlled in a density-dependent manner in these semi-immune children by a cross-species parasite regulatory mechanism involving variant parasite antigens.

Existence of regulatory interactions between parasites in mixed infections has been previously also suggested by Bouharoun-Tayoun et al. (1990). In their experiments, passive transfer of IgG collected from adult immune donors to *P. falciparum* malaria infections, from West Africa, to young Thai patient receivers, with active *P. falciparum* infections, resulted in a significant decrease of the *P. falciparum* parasitaemia and improvement of clinical symptoms. However, in three of the receivers, following administration of the anti-falciparum immune IgG, the development of a new malaria infection by *P. vivax* was observed with an increasing parasitaemia that needed chloroquine treatment.

Malaria surveillance performed by our group in RO resulted in similar effects. After treating all identified symptomatic and asymptomatic *P. falciparum* parasite carriers in the riverside locality of Vila Candelária, no more clinical cases of falciparum malaria were observed in the following year. However, the number of clinical *P. vivax* cases doubled in this locality, from 53 in the previous year to 105 in the following year (Tada 2008, Tada et al. 2012). Both observations might be explained if clearing of the *P. falciparum* parasites results in the elimination of an "inhibitory signal", affecting the multiplication of *P. vivax* parasite cells, either of hypnozoite origin or from a quiescent infection.

These and other observations (Boyd & Kitchen 1938, Maitland et al. 1997) indicate that interactions between parasites affecting population densities in mixed infections do exist, but no convincing mechanisms have been found to explain the nature of the interaction process. It can be speculated that a negative inhibitory factor produced by a dominant species would have an advantageous effect to avoid competition for nutrients obtained from the host and to avoid compromising deleterious effects, which would indirectly compromise the dominant parasite survival. Such a hypothetical inhibitor could be of immunological origin. The authors of studies with semi-immune children in Papua Guinea proposed that parasitaemia are controlled in a density-dependent manner by variant antigens from one of the partners (Bruce & Day 2003). Our results suggest a possible role for PfCLAG9 antigen in which anti-PfCLAG9 antibodies originated during *P. falciparum* infection would recognised a vivax parasite target, possibly the PvCLAG7 ortholog. The following elements in favour of this hypothesis may be presented: (i) PfCLAG9 product seems to participate in metabolic remodelling of PRBC like it was demonstrated for PfCLAG3 (Goel et al. 2010, Nacer et al. 2011, Nguiragool et al. 2011) and suggested for PfClag9, (ii) PvCLAG7 by its similarities with PfCLAG9 seems to represent orthologous molecules (Moreno-Perez et al. 2011) and CLAG8 and (iii) search of similarities between members of the *clag* families of *P. falciparum* and *P. vivax* indicate that similarities between protein is good candidate for being assessed in cellular, immunological and functional studies aimed at establishing its role during invasion (Cowman et al. 2012)

While the clinical immunity status in vivax malaria correlates with repetitive infections (Alves et al. 2002, Gil et al. 2007) we hypothesise that the higher RI anti-PfCLAG9 values observed among asymptomatic *P. vivax* patients (Fig. 2, Table) are originate from a boosting effect by the ortholog PvCLAG7 and eight homologous sequences or, eventually, in mixed infections, directly by PfCLAG9. Immunoclinical follow up of selected mixed infected patients and immuno-parasitological studies are being undertaken in our laboratory to test this hypothesis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Victor Nussenzweig and Dr Luiz Shozo Ozaki, for reviewing the paper, and to all the technical staff of CEPEM, from the Health Department of RO, for patient's examination and care.

## REFERENCES

- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, da Silva LHP, Camargo EP 2002. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 66: 641-648.
- Andrysiak PM, Collins WE, Campbell GH 1986. Concentration of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes from non human primate blood using Percoll gradients. *Am J Trop Med Hyg* 35: 251-254.
- Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisidhi T, Druilhe P 1990. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro*, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 172: 1633-1641.
- Boyd MF, Kitchen SF 1938. Vernal vivax activity in persons simultaneously inoculated with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 18: 505-514.
- Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJ, Morais CG, Martins MS, Krettli AU 2002. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19KD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon Region. *Am J Trop Med Hyg* 66: 461-466.
- Bruce MC, Day KP 2003. Cross species regulation of *Plasmodium* parasitemia in semi-immune children from Papua New Guinea. *Trends Parasitol* 19: 271-277.
- Bruce MC, Donnelly CA, Alpert MP, Galinsk MR, Barwell JW, Waliker D, Day KP 2000. Cross-species interaction in malaria parasites in humans. *Science* 287: 845-848.
- Cao OJ, Kaneko O, Thongkukiakul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M 2009. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein, AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoite. *Parasitol Int* 58: 29-35.
- Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, Crabtree J, Angiuoli SV, Merino EF, Amedeo P 2008. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757-763.
- Cowman AF, Berry D, Baum J 2012. The cell biology of disease: The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol* 198: 961-971.
- de Koning-Ward TF, Gilson PR, Boddey JA, Rug M, Smith BJ, Papenfuss AT, Sanders PR, Lundie RJ, Maier AG, Cowman AF, Crabb BS 2009. A novel protein export machine in malaria parasites. *Nature* 459: 945-949.
- Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* 55: 836-839.
- Gardiner DL, Holt DC, Thomas EA, Kemp DJ, Trenholme KR 2000. Inhibition of *Plasmodium falciparum* *clag9* gene function by antisense RNA. *Mol Biochem Parasitol* 110: 33-41.
- Gardiner DL, Spielmann T, Dixon MW, Hawthorne PL, Ortega MR, Anderson KL, Skinner-Adams TS, Kemp DJ, Trenholme KR 2004. CLAG 9 is located in the rhoptries of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 93: 64-67.
- Gardner MJ, Neil H, Eula F, Owen W, Matthew B, Richard WH, Jane MC, Arnab P, Karen EN, Sharen B, Ian TP, Keith J, Jonathan AE, Kim R, Steven LS, Alister C 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498-511.
- Gil LH, Alves FP, Zieler H, Salcedo JM, Durlacher RR, Cunha RP, Tada MS, Camargo LM, Camargo EP, da Silva LHP 2003. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. *J Med Entomol* 40: 636-641.
- Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PEM, da Silva LHP 2007. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon). II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 271-276.
- Goel S, Valiyaveetil M, Achur RN, Goyal A, Mattei D, Salanti A, Trenholme KR, Gardiner DL, Gowda DC 2010. Dual stage synthesis and crucial role of cytoadherence-linked asexual gene 9 in the surface expression of malaria parasite VAR proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 16643-16648.
- Holt DC, Bourke PF, Mayo M, Kemp DJ 1998. A high resolution map of chromosome 9 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 97: 229-233.
- Holt DC, Fischer K, Tchavtchitch M, Wilson DW, Hauquitz NE, Hawthorne PL, Gardiner DL, Trenholme KR, Kemp DJ 2001. Clags in *Plasmodium falciparum* and other species of *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol* 118: 259-263.
- Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Su XZ, Tanabe K, Torii M 2008. Diversity and evolution of the rhop1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 158: 11-21.
- Kaneko O 2007. Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the *Plasmodium* rhoptry. *Parasitol Int* 56: 255-262.
- Kaneko O, Bryan YS, Lim Y, Iriko H, Ling IT, Otsuki H, Grainger M, Tsuboi T, Adams JH, Mattei D, Holder AA, Torii M 2005. Apical expression of three RhopH1/CLAG proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. *Mol Biochem Parasitol* 143: 20-28.
- Kaneko O, Tsuboi T, Ling IT, Howell S, Shirano M, Tachibana M, Cao YM, Holder AA, Torii M 2001. The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the *clag* multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol* 118: 223-231.
- Karplus PA, Schulz GE 1985. Prediction of chain flexibility in proteins - a tool for the selection of peptide antigens. *Naturwissenschaften* 72: 212-213.
- Katsuragawa TH, Cunha RP, de Souza DC, Gil LH, Cruz RB, Silva Ade A, Tada MS, Pereira-da-Silva LH 2009. Malaria and hematological aspects among residents to be impacted by reservoirs for the Santo Antônio and Jirau Hydroelectric Power Stations, Rondônia state, Brazil. *Cad Saude Publica* 25: 1486-1492.
- Katsuragawa TH, Gil LH, Tada MS, de Almeida e Silva A, Costa JD, Araújo M da S, Escobar AL, Pereira-da-Silva LH 2010. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon Region of Brazil. *PLoS ONE* 5: e9245.
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276: 172-174.
- Lambros C, Vanderberg JP 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65: 418-420.
- Larsen JE, Lund O, Nielsen M 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2: 2.
- Lelievre J, Berry A, Benoit-Vical F 2005. An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization. *Exp Parasitol* 109: 195-197.
- Ling IT, Florens L, Dluzewski AR, Kaneko O, Grainger M, Yim Lim BY, Tsuboi T, Hopkins JM, Johnson JR, Torii M, Bannister LH, Yates JR 3rd, Holder AA, Mattei D 2004. The *Plasmodium falciparum* CLAG9 gene encodes a rhoptry protein that is transferred to the host erythrocyte upon invasion. *Mol Microbiol* 52: 107-118.



- Maitland K, Williams TM, Newbold CI 1997. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*: biological interactions and the possibility of cross-species immunity. *Parasitol Today* 13: 227-231.
- Mayer AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L 2009. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol* 7: 341-354.
- Moreno-Perez DA, Mongui A, Soler LN, Sanchez-Ladino M, Patarroyo MA 2011. Identifying and characterizing a member of the RhopH1/CLAG family in *Plasmodium vivax*. *Gene* 481: 17-23.
- Nacer A, Roux E, Pomel Scheldig-Benatar, Sakamoto H, Scherf A, Mattei D 2011. *clag9* is not essential for PfEMP1 surface expression in non-cytoadherent *Plasmodium falciparum* parasites with a chromosome 9 deletion. *PLoS ONE* 6: e29039.
- Nugrahaool W, Bokhari AAB, Pillai AD, Rayavara K, Sharma P, Turpin Baravind L, Desai SA 2011. Malaria parasite *clag3* genes determine channel mediated nutrient uptake by infected red blood cells. *Cell* 145: 665-677.
- Parker JM, Guo D, Hodges RS 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25: 5425-5432.
- Richard D, Mac Raild CA, Riglar DT, Cham JA, Foley M, Baum J, Ralph SA, Norton RS, Cowman AF 2010. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem* 285: 14815-14822.
- Shirley MW, Biggs BA, Forsyth KP, Brown HJ, Thompson JKG, Kemp DJ 1990. Chromosome 9 from independent clones and isolates of *Plasmodium falciparum* undergoes subtelomeric deletions with similar breakpoints *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol* 40: 137-145.
- Snounou G 1996. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Meth Mol Biol* 50: 263-291.
- Tada MS 2008. *Epidemiologia da malária em área urbana e sub-urbana de Porto Velho. Ensaio preliminares de inovação em métodos de controle*, PhD Thesis, Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 111 pp.
- Tada MS, Ferreira RGM, Katsuragawa TH, Martha RCD, Costa JDN, Albrecht L, Wunderlich G, da Silva LHP 2012. Asymptomatic infections by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Brazilian Amazon Basin: to treat or not to treat? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 621-629.
- Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Martha RCD, Rodrigues JA, Costa JDN, Pepelascov RR, Katsuragawa TH, Pereira-da-Silva LH 2007. Urban malaria in the Brazilian western Amazon Region. I. High prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 263-269.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Trager W, Jensen JB 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673-675.
- Trenholme KR, Boutlis VS, Kuns R, LaGog M, Bockarie M, Gatton ML, Kemp DJ, Good MF, Anstey NM, Gardiner DL 2005. Antibody reactivity to linear epitopes of *Plasmodium falciparum* cytoadherence-linked asexual gene 9 in asymptomatic children and adults from Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 2: 708-713.
- Trenholme KR, Gardiner DL, Holt DC, Thomas EA, Cowman AF, Kemp DJ 2000. *clag9*: a cytoadherence gene in *Plasmodium falciparum* essential for binding of parasitized erythrocytes to CD36. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4029-4033.
- Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, Corcoran LM, Burkot TR, Carter R 1987. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 236: 1661-1666.





## FORMULÁRIO CLÍNICO INDIVIDUAL (FRENTE)

1) Médico Responsável:

2) Antecedentes mórbidos pessoais:

Assinale o quadrado abaixo com “x” se resposta for sim, e preencha os demais campos referentes a esta doença.

a) malária	<input type="checkbox"/>	nº episódios: ____	tempo desde último episódio: ____	espécie: V <input type="checkbox"/>
				F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>
Quando		Informações Complementares/ Comentários		
b) hepatite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe	tipo: A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> não sabe <input type="checkbox"/>
c) tuberculose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe		
d) leishmaniose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe		
e) dengue	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe	Quantos episódios:	
f) hansen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe		
g) pneumonia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe	Quantos episódios:	
h) diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe		
i) hipertensão	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe		
j) cardiopatia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe		
k) diarreia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não sabe	Nº episódios no último ano:	

l) internação:   Não sabe: Nº \_\_\_\_ Motivo:

---

m) cirurgias:   Não sabe: Qual

n) hemotransfusão:   Não sabe: Indicação:

o) outras doenças:   Não sabe: Quais:

Observações:

## Formulário clínico epidemiológico individual (verso)

## 3. Anamnese

---

---

---

## 4. Exame físico (0 = não; 1 = sim)

PA \_\_\_\_ / \_\_\_\_ mmHg Tax \_\_\_\_ °C Fp \_\_\_\_ bpm Fr \_\_\_\_ rpm Peso \_\_\_\_ kg  
Altura \_\_\_\_ m

Estado geral: bom [ ] regular [ ] ruim [ ]      hidratação:

---

Ganglios: \_\_\_\_\_

---

Pele: \_\_\_\_\_

---

Mucosas: \_\_\_\_\_

---

Orofaringe: \_\_\_\_\_

---

Neuro: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ap cardioresp. \_\_\_\_\_

Abdome: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Fígado \_\_\_\_\_ Baço \_\_\_\_\_

Membros: superiores: \_\_\_\_\_

Inferiores: \_\_\_\_\_

Diagnósticos: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Exames:

<b>Identificação:</b>
-----------------------

--	--	--	--	--	--	--	--

Localidade

Casa

Número paciente

---

(Nome do participante por extenso, legível)

---

(Assinatura do participante ou responsável.)

---

Data: ...../...../.....

<b>FORMULÁRIO INDIVIDUAL</b>
------------------------------

1-Dados pessoais:

Registro \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . \_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone p/ Contato: \_\_\_\_\_ N°. FNS: \_\_\_\_\_ Moradia

---

DN. \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Grau de Instrução \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Procedência:

(último local de moradia) \_\_\_\_\_

Tempo em Rondônia: \_\_\_\_\_

Tempo no endereço atual: \_\_\_\_\_ anos \_\_\_\_ meses

Sexo:  Fem  Masc.

Ocupação principal: \_\_\_\_\_

Ocasional \_\_\_\_\_

Onde esteve nos últimos 20 dias: \_\_\_\_\_

Tempo de permanência na área endêmica: Anos \_\_\_\_\_ Meses: \_\_\_\_\_

Malária atual : \_\_\_\_\_

Método(s) usado p/ o diagnóstico: \_\_\_\_\_

Parasitemia: \_ \_\_\_\_\_

Queixa Principal:

Há quantos dias começou a ficar doente? \_\_\_\_\_

O que você sentiu no início da doença? \_\_\_\_\_

Fez uso de medicação nos últimos dias \_\_\_\_\_

Antimaláricos: \_\_\_\_\_;

Antibióticos: \_\_\_\_\_

Chás: \_\_\_\_\_;

outros: \_\_\_\_\_

Outra Informação clinica relevante: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

---

---