



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

**IMPLANTAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS
DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS INFECTADOS POR *Plasmodium
falciparum* COMO POSSÍVEIS ALVOS DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DISTINTA EM PACIENTES ASSINTOMÁTICOS PARA
MALÁRIA**

Rodrigo Simões Silva

PORTO VELHO, RO – DEZEMBRO 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

**IMPLANTAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS
DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS INFECTADOS POR *Plasmodium
falciparum* COMO POSSÍVEIS ALVOS DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DISTINTA EM PACIENTES ASSINTOMÁTICOS PARA
MALÁRIA**

Rodrigo Simões Silva

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Rondônia - UNIR, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stábili

PORTO VELHO, RO – DEZEMBRO 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

S5861i

Silva, Rodrigo Simões

Implantação de métodos para detecção de proteínas de membrana de uritrocitos infectados por *plasmodium falciparum* como possíveis alvos da resposta imunológica distinta em pacientes assintomáticos para malária / Rodrigo Simões Silva. Porto Velho, Rondônia, 2011.

75f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR.

Bibliotecária Responsável: Ozelina Saldanha CRB11/947

Candidato: Rodrigo Simões Silva

Título da Dissertação: IMPLANTAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS INFECTADOS POR *Plasmodium falciparum* COMO POSSÍVEIS ALVOS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DISTINTA EM PACIENTES ASSINTOMÁTICOS PARA MALÁRIA

Defesa da Dissertação do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia, nível Mestrado, em Sessão Pública realizada em 05 de Dezembro de 2011.

Banca Examinadora

1) **Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stábeli** - Orientador

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) **Prof. Dr. Alexandre de Almeida e Silva** - UNIR

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) **Prof. Dr. Tony Hiroshi Katsuragawa** – IPEPATRO – Porto Velho

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha namorada Juliana, pelo apoio e compreensão no desenvolvimento deste trabalho, e a minha mãe Vera Lúcia e ao meu irmão Glauber Simões pelo auxílio durante estes anos de Mestrado...

EPÍGRAFE

" Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe; eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou nada sei..."

Almir Sater

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rodrigo Stábeli, pelo exemplo como pesquisador e pessoa. Obrigado pela confiança, apoio e constante incentivo depositado a mim.

Ao CNPQ pela bolsa e apoio financeiro do projeto.

Ao Dr. Gerhard Wunderlich e ao Dr. Mauro Ferreira da Universidade de São Paulo (USP) pelo apoio e auxílio no processo de cultivo do parasita e extração das proteínas de membrana.

A Dr^a Angela Mehta e seus colaboradores da EMBRAPA de Brasília pelo apoio e auxílio na aprendizagem da técnica de eletroforese 2D .

A Dr. Tony Katsuragawa e seus colaboradores do IPEPATRO pelo fornecimento dos soros utilizados nesta pesquisa.

Ao Dr. Leonardo Calderon, chefe do Centro de Estudos em Biomoléculas aplicadas a Medicina (CEBio).

Ao amigo Anderson Kayano (o Sr Makoto) que com sua sabedoria e paciência oriental tem sido um verdadeiro co-orientador.

Ao amigo de caminhada José de Lima, cujas boas discussões sempre me incentivaram a estudar cada vez mais.

Ao amigo Leandro Moreira, pelo apoio e auxílio prestado na etapa final deste trabalho, tenho certeza que este é o início de uma grande parceria.

A Kayena Delaix pelo carinho e a amizade conquistada durante este período.

A Andréa Augsburguer pela amizade e o grande auxílio na execução da etapa final deste trabalho.

Aos amigos do CEBio, Toninho, Roniele, Angela, Kaynara, Rafaela, João, Leandro Costa e Tiago.

Ao meu irmão Glauber, pelo acolhimento e apoio quando cheguei a Porto Velho.

Agradeço a paciência e dedicação de minha namorada, Juliana C. Sobrinho, que com carinho acompanhou a edição deste trabalho. Agradeço também pelo apoio e confortante presença nas minhas decisões.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para conclusão deste trabalho.

RESUMO

Mesmo após 130 anos da descoberta do agente causador da malária, cerca de 250 milhões de pessoas, com aproximadamente 1 milhão de mortes, ainda são acometidas por malária todos os anos. Na tentativa de encontrar uma forma de alterar este cenário, este trabalho buscou subsídios através de metodologias para detecção de proteínas da membrana de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum*, com diferentes determinantes imunoquímicos relevantes para a resposta imunológica humoral diferencial em pacientes assintomáticos. Realizou-se uma comparação, através de eletroforese e *western blot*, do perfil de imunorreatividade para diferentes tipos de soros de pacientes infectados nas condições clínicas evidentes sintomáticas e assintomática. Foi padronizado o método de separação por eletroforeses uni- e bi-dimensional, bem como o método de identificação de proteínas imunorreativas por *western blot*. Os resultados obtidos mostraram uma grande diferença do perfil de resposta imunológica entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Foram marcadas proteínas da membrana de eritrócitos infectados por *P. falciparum* imunorreativas para soro de paciente assintomático, que, após processo de identificação poderão ser úteis para o entendimento da aquisição da proteção humoral em pacientes assintomáticos. Em eletroforese 2D, observou-se um grande número de *spots*, mostrando que este método é útil e será utilizado para separação destas proteínas de interesse para identificação futura. Além disso, a técnica de *western blot* associada a separação em 2D, revelou um número de proteínas imunorreativas maior, quando comparado com aquele proveniente da eletroforese unidimensional. A importância do reconhecimento por anticorpos das proteínas e sua relação a proteção/suscetibilidade de doadores de plasma é discutida.

Palavras-chaves: Malária falcípara, assintomática, sintomática, resposta humoral, imunoquímica, eletroforese uni e bidimensional.

ABSTRACT

Even 130 years after the discovery of the causative agent of malaria, about 250 million people are infected by *Plasmodium* sp. every year, resulting in approximately 1 million deaths. In this study, we tried to identify possible targets of the protective immune response against the *P. falciparum* infected red blood cell. This was done by one and two-dimensional electrophoresis followed by Western blot using plasmas from individuals with symptomatic or asymptomatic *P. falciparum* infection. During the study, we standardized the method of separation by one- and two-dimensional electrophoresis, as well as the method of identification of immunoreactivity proteins by western blot. The results showed a significant difference in the number of recognized proteins between symptomatic and asymptomatic individuals. The identification of proteins which were recognized exclusively by asymptomatic patients may indicate novel targets of the humoral response against blood stage parasites. We also discuss the impact of this response and its possible relation of the course of infection observed in patients.

Keywords: falciparum malaria, asymptomatic, symptomatic, humoral response, immunochemical, one and two dimensional electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina.
01 Distribuição geográfica da malária no mundo (2011).....	14
02 Mapa das áreas de risco de transmissão da malária no Brasil, em 2010, baseado na incidência parasitária anual.....	15
03 Casos de malária no Brasil de 1960 a 2008.....	16
04 Evolução dos casos de malária em Rondônia de 1974 a 2010.....	17
05 Ciclo de vida das espécies de <i>Plasmodium</i> infectantes ao homem.....	18
06 Esquema representativo de uma eletroforese bidimensional.....	33
07 Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% de proteínas de membrana de eritrócito não infectado (HNI) e proteínas de membrana de eritrócito infectado com <i>P. falciparum</i> (HI).....	46
08 <i>Western blot</i> realizado com soro de paciente nunca antes exposto a infecção por malária (PINSN-01).....	49
09 <i>Western blot</i> realizado com soro de paciente sintomático e infectado por malária (PIPSP-01).....	50
10 <i>Western blot</i> realizado com soro de paciente sintomático e infectado por malária (PIPSP-02).....	51
11 <i>Western blot</i> realizado com soro de paciente infectado e assintomático (PIPSN-01).....	52
12 <i>Western blot</i> realizado com soro de paciente infectado e assintomático (PIPSN-02)	53
13 <i>Western blot</i> realizado com soro de paciente infectado e assintomático (PIPSN-03).....	54
14 Comparação entre os resultados de imunorreatividade obtidos através de <i>western blot</i> para cada um dos três tipos de soros.....	55

15	<i>Esqueleto de uma membrana não infectada (a) e infectada com P. falciparum (b)</i>	59
16	Perfil eletroforético em 2D-PAGE 10%, fita 13 cm pH 3-10NL de proteínas de membranas de hemácias não infectadas (HNI).....	61
17	Perfil eletroforético em 2D-PAGE 10%, fita 13 cm pH 3-10NL de proteínas de membranas de hemácias infectadas com <i>P. falciparum</i> (HI)	61
18	Comparação qualitativa dos resultados de separação de proteínas de membranas de hemácias não infectadas obtidos em três diferentes trabalhos.....	62
19	Comparação qualitativa dos resultados de separação de proteínas de membranas de hemácias infectadas por <i>P. falciparum</i> obtidos em três diferentes trabalhos.....	63
20	<i>Western blot</i> realizado com soro de paciente infectado e assintomático (PIPSN-03). Perfil eletroforético em 2D-PAGE 10%, fita 13 cm pH 3-10NL de proteínas da membrana de eritrócito infectado com <i>P. falciparum</i> (HI).....	64
21	Comparação qualitativa dos resultados de separação de: (A) Perfil eletroforético. (B) <i>Western Blot</i>	65

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
01 Parâmetros analisados para classificar um indivíduo em sintomático ou assintomático.....	48
02 Características de algumas proteínas exportadas do <i>P. falciparum</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEBio - Centro de Estudos em Biomoléculas Aplicadas à Medicina

CSP – Proteína Circumsporozoíta

DAB – 3,3'-tetrahidrocloro de diaminobenzidina

EBA-175 – Antígeno que liga-se ao eritrócito com massa de 175kDa.

EXP – Proteína Exportada

HI – Proteínas de membranas de hemácias infectadas por *P. falciparum*

HNI – Proteínas da membranas de hemácias não infectadas

IFN- γ – Interferon- γ

IL-4 – Interleucina 4

IL-10 – Interleucina 10

Ig – Imunoglobulinas

IPEPATRO – Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais

MAHRP1 – *Membrane-associated His-rich protein 1*

MC – *Maurer's cleft*

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MSP-1 – *Merozoite Surface Protein-1*

MESA – Antígeno da superfície de eritrócito infectado com parasita maduro.

PBST – Solução fisiológica tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7.4 contendo 0,05% de Tween 20

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

Pf155 – Antígeno 155kDa de *P. falciparum*

PfEMP1 – Proteína 1 da membrana de eritrócito infectado por *Plasmodium falciparum*

PfSBP1 – *P. falciparum skeleton-binding protein*

PINSN – Paciente, Infecção (Negativo), Sintomas (Negativo)

PIPSN – Paciente, Infecção (Positivo), Sintomas (Negativo)

PIPSP – Paciente, Infecção (Positivo), Sintomas (Positivo)

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RESA – Antígeno da superfície de eritrócito infectado com parasita estágio anel.

REX1 – Proteína exportada do anel

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Th1 – “T helper 1”

TRAP – Proteína relacionada à adesão à trombospondina.

VSA – Antígenos de superfície variante

SUMÁRIO

Dedicatória	I
Epígrafe	II
Agradecimento	II
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
Lista de Figuras.....	VI
Lista de Quadros.....	VIII
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	IX
Sumário	XI
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 – Malária.....	13
1.2 – Ciclo de Vida do Parasita.....	18
1.3 – Resposta Imune.....	20
1. 4 – Infecção Assintomática.....	23
1. 5 – Eletroforese.....	27
1. 5.1 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	29
1. 5. 2 – Eletroforese em uma Dimensão (1D-PAGE).....	30
1. 5. 3 – Eletroforese em duas Dimensões (2D-PAGE).....	31
1. 6 – A Técnica de <i>Western Blot</i>	34
2. OBJETIVOS.....	36
3. METODOLOGIA.....	37
3. 1 – Obtenção dos Soros.....	37

3. 2 – Cultivo do Parasita <i>Plasmodium falciparum</i> Cepa 3d7.....	37
3. 3 – Extração de Proteínas de Membranas de Hemácias Não-Infectadas e Infectadas.....	38
3. 4 – Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....	39
3. 5 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	39
3. 6 – Otimização da Metodologia para a Separação por 2D-PAGE.....	41
3. 7 – Separação Eletroforética em Duas Dimensões (2D-PAGE).....	41
3. 8 – <i>Western Blot</i>	43
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5 – CONCLUSÃO.....	66
6 – REFERÊNCIAS	67

1 – INTRODUÇÃO

1.1– Malária

A malária é uma doença causada por protozoários intracelulares do filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Neste gênero são identificadas cerca de 120 espécies, incluindo parasitos de roedores, aves, répteis, primatas não humanos e humanos. Entre estas espécies apenas quatro podem infectar humanos: *Plasmodium falciparum* (WELCH, 1897), *Plasmodium vivax* (GRASSI & FELETTI, 1890), *Plasmodium malarie* (LAVERAN, 1881) e *Plasmodium ovale* (STEPHENS, 1922). Os parasitos que causam a malária são transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* (BRUCE-CHWATT, 1985; NEVES, 2005).

Trata-se de uma das doenças parasitárias mais comum, causadora de mortalidade e morbidade em países localizados em regiões tropicais e subtropicais, e continua sendo o maior desafio em saúde pública em todo o mundo (DOOLAN et al., 2003; GOOD et al., 2005; WHO, 2011). Embora tenha sido descrita há cerca de cento e vinte anos, a doença tem resistido a todas as formas de controle empregadas até hoje (GOOD et al., 2005; WHO, 2008). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram um total de 106 países endêmicos para a doença no ano de 2011, dentre os quais 45 pertencem ao continente africano (WHO, 2011).

Estimativas indicam que a população sob risco de malária é 3,3 bilhões de pessoas (WHO, 2011). Embora a grande maioria das mortes causadas por malária ocorra na África, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania (Figura 1). Enquanto *P. falciparum* prevalece no

continente africano, o *P. vivax* é a espécie prevalente na Ásia e América Latina (PALMER et al., 1998; SHARMA, 1999; SAN SEBASTIAN et al., 2000).



Figura 1: Distribuição geográfica da malária no mundo (2011). Fonte: WHO, 2011.

No Brasil, a malária continua sendo um importante problema de saúde pública, sendo uma das doenças parasitárias mais importantes da região tropical, onde 99% das notificações anuais de casos de malária provêm da região que compreende os estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão (Figura 2).

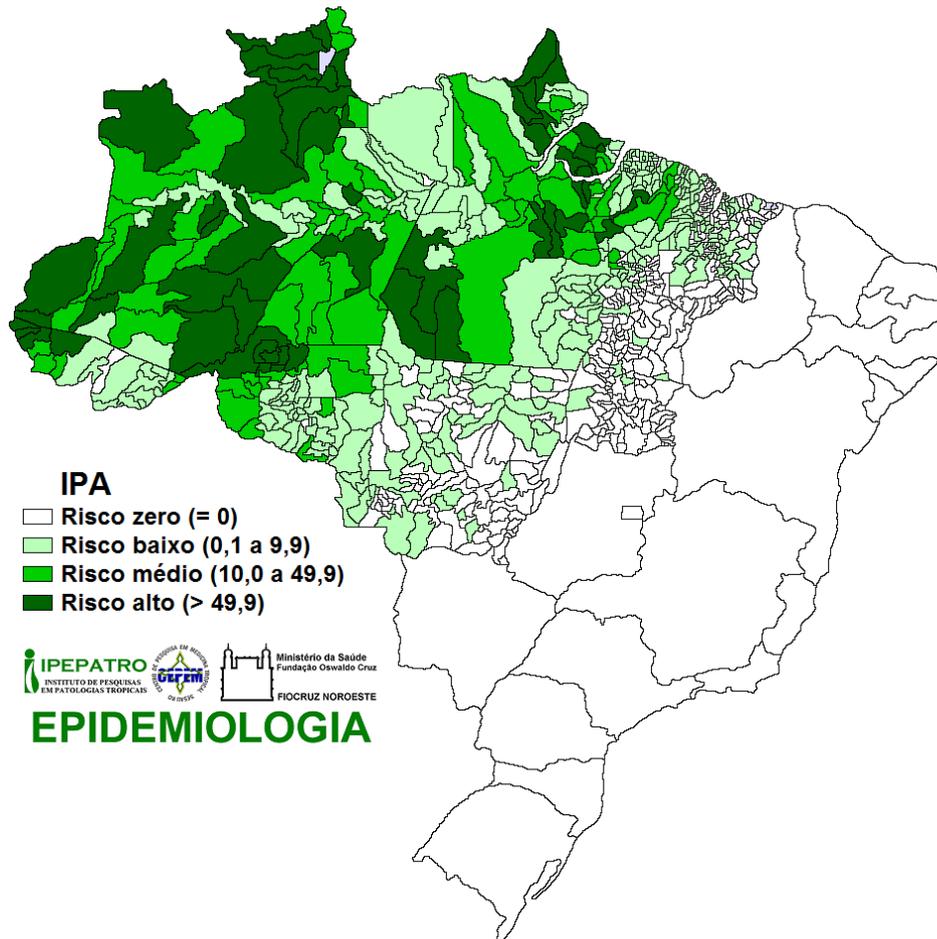


Figura 2: Mapa das áreas de risco de transmissão da malária no Brasil, em 2010, baseado na incidência parasitária anual. Fonte de dados: SIVEP-Malária. Fonte da imagem: Laboratório de Epidemiologia IPEPATRO-CEPEM-FIOCRUZ Rondônia.

Apesar do alto número de casos registrados anualmente até 2005, observa-se na Figura 3, uma diminuição gradativa do número de infecções. Em 2006, segundo dados do Ministério da Saúde, foram registrados 540.000 casos de malária (99,7% na região Norte), um pouco menos que os 580.000 casos registrados em 2005. Já em 2009 o número de infecções foi de 303.000 (SIVEP-MALÁRIA, 2010), 43,8% menor que em 2006. Outro fator interessante é que, 85% destas infecções estão atribuídas a *P. vivax*, apontando que houve uma redução no número de casos por *P. falciparum*, que evolui mais rapidamente para as formas graves da doença. Em 2006 a malária por *P. falciparum* correspondeu a 26% dos casos de malária no país, enquanto que em 2008 essa proporção correspondeu a 15% (OPAS, 2009). Apesar

dessa diminuição no número de casos, o perfil histórico epidemiológico da doença demonstra que seu controle efetivo requer intervenções focais, mas permanentes.

Casos de Malária no Brasil, 1960-2008

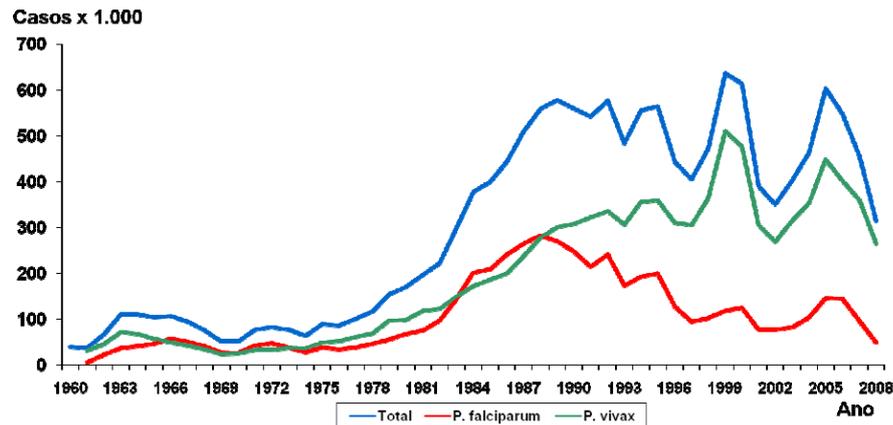


Figura 3: Casos de malária no Brasil de 1960 a 2008. Fonte: SISMAL/SIVEP/SVS/MS – atualizado em set/2009.

No contexto nacional, a incidência de malária no estado de Rondônia está intimamente relacionada aos fenômenos migratórios. Dentre estes, podemos destacar aqueles oriundos do 1º ciclo da borracha no final do século XIX, com a construção da Estrada de Ferro Madeira Mamoré que acabou trazendo milhares de trabalhadores de diversas partes do Brasil e do mundo para o estado e o ocorrido na segunda metade do século XX, causado pelo projeto de integração nacional do governo militar, que abriu estradas para a região e criou projetos de colonização, além da descoberta de grandes aluviões de ouro nos leitos de seus rios. Os emigrantes dessa onda vieram, sobretudo da Região Sul, que sofria as consequências do processo de modernização e mecanização da agricultura, e da Região Nordeste, com o desemprego crônico. Este fato culminou na elevação da população de 491.069, na década de 80, para 1.453.756 habitantes em 2007 (KATSURAGAWA et al., 2008).

Ao final da década de 1980, a incidência parasitária anual (IPA), que corresponde ao número de casos de malária por mil habitantes, em Rondônia era de 128/1.000 (BARATA, 1995). Este estado registrava quase a metade dos casos do país. Essa crise levou o governo federal a fortalecer a campanha de controle, criando centenas de unidades para diagnóstico, tratamento e combate ao vetor nas áreas endêmicas (KATSURAGAWA et al., 2008). O resultado obtido foi muito positivo. A figura 4 ilustra a queda progressiva de incidência que desceu para 50 mil casos em 1996. Entretanto, a queda de qualidade das ações de controle refletiu em um aumento dos níveis de incidência nos primeiros anos da década de 2000, superando de novo 100 mil casos em 2004, o que mostra a importância da continuidade das medidas de controle (KATSURAGAWA et al., 2008).

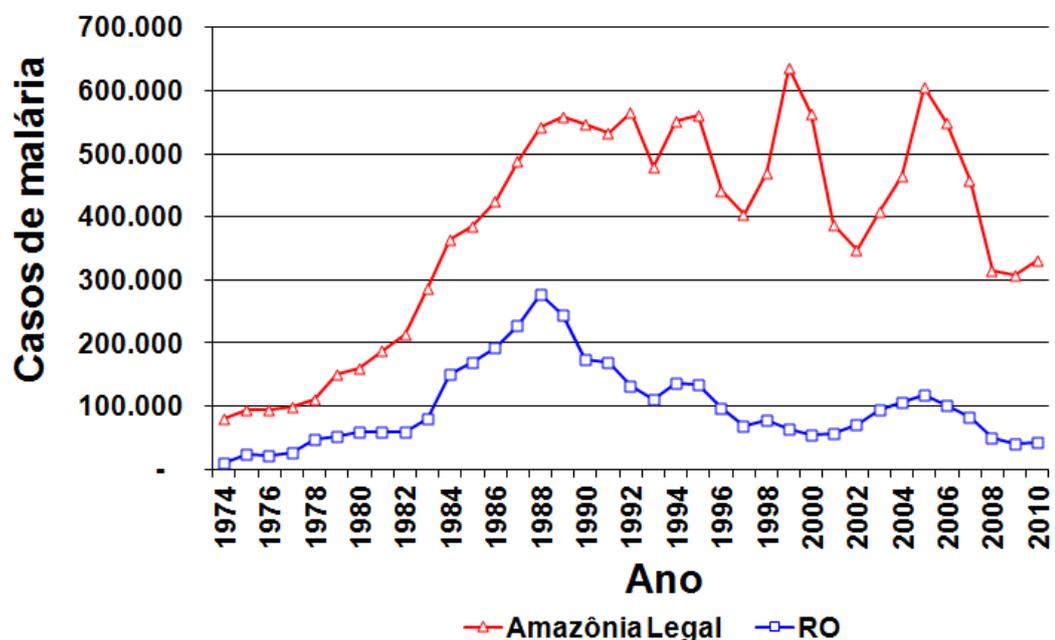


Figura 4: Evolução dos casos de malária em Rondônia de 1974 a 2010. Fonte: Gerência Técnica de Malária/CCDTU/DEOPE/FNS; SIM/CENEPI/FNS; SVS - SIVEP-Malária; Rey, 2003.

Atualmente, Rondônia é considerado o terceiro estado com maior risco de transmissão de malária na região Amazônica, destacando-se em primeiro lugar o Pará e em segundo o Amazonas. Em 2009, foram notificados 41.298 casos de

malária, no estado, o que representa 13,65% do total de casos de malária na região (SIVEP-MALÁRIA, 2010).

1.2 – Ciclo de Vida do Parasita

O gênero *Plasmodium* foi definido baseando-se no ciclo de vida do parasita (Figura 5), com uma fase de reprodução sexuada seguida por três fases de reprodução assexuada. A fase sexuada (fertilização) ocorre no lúmen do estômago do mosquito *Anopheles* e a primeira fase assexuada (esporogonia), no epitélio do estômago e corpo do mesmo; as outras duas fases ocorrem em um hospedeiro vertebrado, a segunda fase assexuada ocorre no fígado (esquizogonia exoeritrocítica) e a terceira ocorre na circulação sanguínea (esquizogonia eritrocítica) (KNELL, 1991).

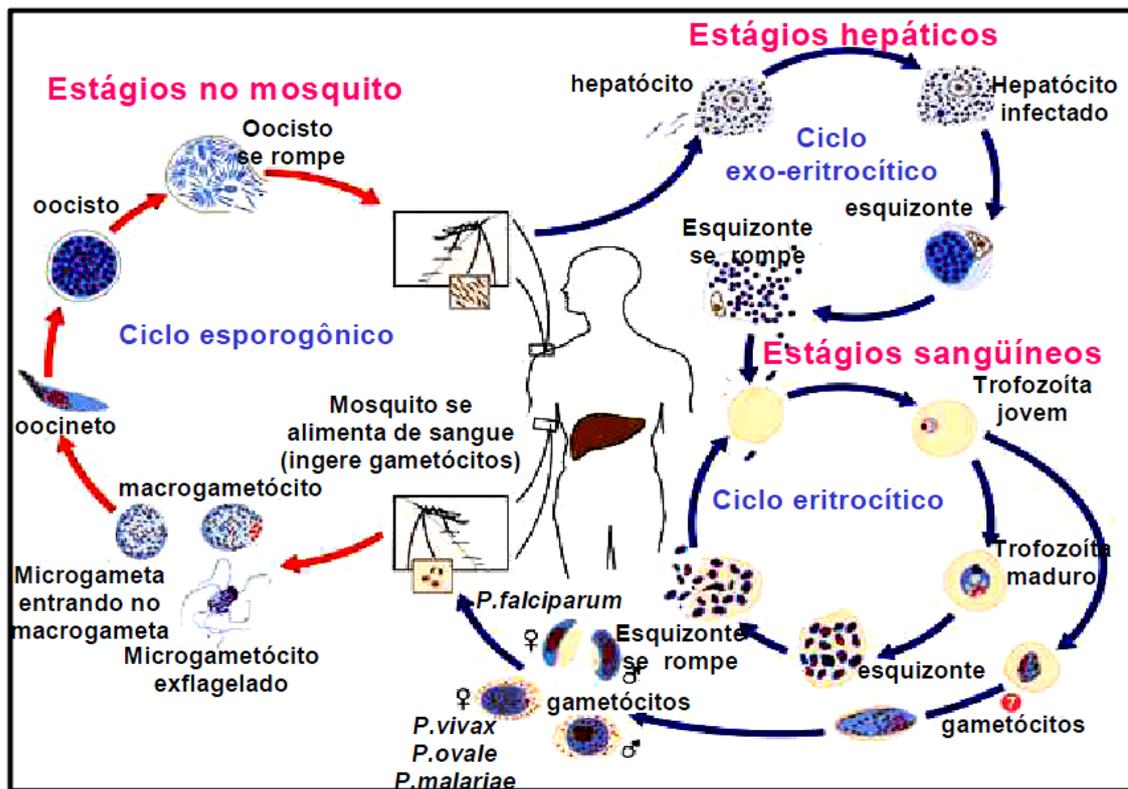


Figura 5: Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* infectantes ao homem (adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov>).

Os esporozoítos são transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada da fêmea do gênero *Anopheles* e caem rapidamente na circulação sanguínea até chegarem aos hepatócitos. Estudos feitos demonstraram que os esporozoítos passam por vários hepatócitos antes da invasão e o subsequente desenvolvimento hepático (MOTA et al., 2001).

O processo de invasão envolve proteínas de superfície do esporozoíto, como domínios de ligação de trombospondina na proteína circumsporozoíta (CSP), a própria proteína relacionada à adesão à trombospondina (TRAP) e moléculas de superfície do hospedeiro vertebrado (FUJIOKA & AIKAWA, 2002; WEATHERALL et al., 2002). Estes domínios ligam-se especificamente a sulfato de proteoglicanos nos hepatócitos no endotélio sinusoidal e nas células de Kupffer (MILLER et al., 2002). Após a invasão, os esporozoítos se alojam dentro de um vacúolo parasitóforo e se transformam em trofozoítos hepáticos que amadurecem e formam milhares de merozoítos, os quais são liberados na circulação sanguínea mediante os merossomos (STURM et al., 2006) e invadem os eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica. No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos não se desenvolvem e podem formar um estágio dormente, chamado hipnozoíto, que pode permanecer no fígado por semanas a anos, e quando reativado provoca recidivas da doença (REY, 2008).

No ciclo eritrocítico, os merozoítos passam por um processo de amadurecimento para formação de trofozoítos, que realizam várias divisões para formação de esquizontes. Os esquizontes rompem os eritrócitos, liberando 16-32 merozoítos e assim recomeça uma nova invasão nos eritrócitos. Concomitantemente, uma pequena proporção de merozoítos diferencia-se em gametócitos macho e fêmea. Estes, ao serem ingeridos pelo mosquito se

transformam em gametas e ocorre a fertilização no lúmen do estômago do mosquito com a formação dos oocinetos. Os oocinetos atravessam duas barreiras, a matriz peritrófica (PM) e o epitélio do estômago, para a formação dos oocistos, que passam por um processo complexo de desenvolvimento, incluindo meiose, para a produção de milhares de esporozoítos e chegam à glândula salivar do mosquito (BRUCE-CHWATT, 1985; FUJIOKA et al., 2002). Quando o mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, carregando esporozoítos nas glândulas salivares, se alimentar novamente, irá infectar outro hospedeiro e desta maneira iniciará um novo ciclo.

1.3 – RESPOSTA IMUNE

A imunidade à malária envolve tanto a resposta celular como a humoral. As células T são essenciais na regulação da produção de anticorpos e na indução da imunidade celular (GOOD et al., 2005; GONÇALVES, 2010).

Contrariamente, à situação da maioria das infecções virais e bacterianas na malária, a resposta imune protetora não é particularmente efetiva. Várias parecem ser as causas como: (i) a estrutura dos antígenos parasitários e sua considerável diversidade que dificulta a resposta imune, influenciando a sobrevivência do parasita e a transmissão ao vetor; (ii) a liberação de exo-antígenos e/ou de mediadores celulares produzidos em resposta ao parasita modulam a resposta imune tornando-a menos eficiente (imunodepressão, ativação policlonal, produção de auto e heteroanticorpos, hipergamaglobulinemia); (iii) a localização intracelular do parasita; e (iv) a ausência de moléculas de MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) no eritrócito concorre para que estes proporcionem um meio relativamente favorável ao crescimento do plasmódio (revisado em KORBEL et al., 2004; STEVENSON & RILEY 2004; DOOLAN et al., 2009).

Com isso, a resposta imune contra *Plasmodium* pode ser desenvolvida especificamente contra cada um dos estágios do parasito (GOOD et al., 2005). Tem sido demonstrado em modelos experimentais que a sobrevivência à malária é ligada à habilidade de controlar a reprodução dos estágios sanguíneos do parasito nas primeiras semanas após a infecção (STEVENSON & RILEY 2004). De fato, as formas sanguíneas dos plasmódios são as responsáveis pelas manifestações patológicas da doença, uma vez que os sintomas clínicos são decorrentes do desenvolvimento parasitário durante o ciclo assexuado sanguíneo. A imunidade frente a esses estágios sanguíneos poderia contribuir para a redução ou a eliminação dos parasitos e, conseqüentemente, diminuição das manifestações clínicas da doença (BUENO, 2011).

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

baixos ou mesmo níveis indetectáveis por métodos convencionais de detecção do parasito (WEBSTER & HILL, 2003).

Em regiões de transmissão intensa e estável, onde o *P. falciparum* é espécie predominante, os recém-nascidos são protegidos da morbidade, provavelmente devido à transferência de anticorpos maternos (EDOZIEN et al., 1962; MCGREGOR, 1964; CHIZZOLINI et al., 1991; HOGH et al., 1995) e à persistência da hemoglobina fetal (PASVOL et al., 1977). De fato, experimentos de transferência passiva de anticorpos, realizados nas décadas de 60 e 70, demonstraram claramente que anticorpos contra as formas sanguíneas estão envolvidos na imunidade protetora (COHEN & BUTCHER., 1971). Estes experimentos foram posteriormente repetidos, confirmando que anticorpos IgG purificados de soros de adultos imunes, residentes em áreas hiperendêmicas, são capazes de controlar a infecção por *P. falciparum* em crianças, reduzindo a parasitemia e protegendo-as de doença grave (Sabchareon et al., 1991).

Na resposta contra os estágios sanguíneos, a eliminação do parasito parece ocorrer após desenvolvimento de uma resposta específica de anticorpos a antígenos variantes de superfície (VSA - *variant surface antigens*) (GUPTA & DAY, 1994; GOOD et al., 2005). Evidências obtidas na última década mostraram que pelo menos dois mecanismos estão envolvidos, tais como, a participação de anticorpos opsonizantes que promovem a fagocitose de eritrócitos infectados (GARRAUD et al., 1989; GARRAUD et al., 1994) e a presença de anticorpos citofílicos (subclasses IgG1 e IgG3, em humanos) que promovem a inibição do crescimento do parasito intra-eritrocítico em associação com monócitos (DRUILHE & KHUSMITH, 1987; LUNEL & DRUILHE, 1989). Entretanto, apesar dos anticorpos contra as formas

sanguíneas ser um importante fator na eliminação do parasito, a imunidade mediada por células contribui nesse processo (GOOD et al., 2005).

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

Em todos os casos, os anticorpos são importantes mediadores da imunidade adquirida contra a malária, pois promovem a inibição da invasão das hemácias pelos merozoítos, promovem a fagocitose de hemácias, bloqueiam a invasão dos parasitas intraeritrocíticos, e ajudam na inibição celular dependente de anticorpos (GOOD et al., 2005).

Nesse contexto, é importante a identificação de antígenos que são alvos de anticorpos e que possam ser utilizados em estudos imunoepidemiológicos visando melhora na compreensão da imunidade naturalmente adquirida à malária.

1.4 – INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA

Após múltiplas infecções o indivíduo morador da área endêmica pode adquirir imunidade e não mais manifestar os sintomas clínicos da doença, mesmo na presença do parasita. Acredita-se que a diminuição dos sintomas clínicos possa ser

devido a anticorpos contra os estágios eritrocitários do parasita, uma vez que é nesta fase que os sintomas clínicos se manifestam (GUPTA et al., 1999).

Indivíduos infectados, mas sem manifestações de sintomas clínicos, possuem um vasto repertório anti-VSA (*variant surface antigens*), existindo uma correlação positiva entre positividade para o parasita e reconhecimento de VSAs, embora apenas a presença do parasita não possa ser associada à proteção contra sintomas de malárias subsequentes (BULL et al., 2002).

As crianças que tiveram malária grave adquirem imunidade logo após poucas infecções, tornando-se parcialmente imune logo nos primeiros anos de vida. Ao contrário, crianças que apenas tiveram malária moderada (não-complicada) levam mais tempo para adquirir o mesmo grau de imunidade (BAIRD, 1995; BAIRD 1998). Os jovens e adultos moradores de área endêmica, mesmo em constante contato com o agente infectante raramente ficam doentes devido à infecção por malária (HVIID, 2005). Isto não significa dizer que a imunidade é esterilizante, ela é apenas parcial, onde os sintomas observados vão aos poucos diminuindo, e por vezes até mesmo desaparecendo por completo. Em alguns casos, apenas testes mais sensíveis, como o PCR, podem confirmar a presença do parasita (ALVES et al., 2002).

Embora com o passar do tempo, moradores de área endêmica tendem a apresentar um menor número de sintomas relacionados a esta patologia, um caso muito particular acontece durante a gravidez. As mulheres nas primeiras gestações podem desenvolver um quadro grave denominado malária gestacional. Embora a gestante possa ter passado anos sem sentir os sintomas da doença por sucessivas infecções maláricas, durante a gravidez, e em particular na primeira e segunda gestação, é comum o desenvolvimento de quadro clínico. Contudo durante

gestações subsequentes, a mulher já possui anticorpos contra estas variantes, e no caso de nova infecção com *P. falciparum* não sofrerá mais problemas graves com malária gestacional (ROGERSON et al., 2007).

Com base nisso, a imunidade contra os sintomas da malária parece depender da idade e do tempo de exposição dos indivíduos infectados e dos níveis de transmissão da região (GUPTA et al., 1999). Foi proposto que em regiões hiperendêmicas, uma redução na transmissão provocaria inicialmente uma redução na malária grave e na mortalidade, mas que uma maior redução aumentaria a mortalidade relativa, o que não seria necessariamente um problema uma vez que o número de infecções seria muito mais baixo, assim como o número absoluto de mortes (REYBURN et al., 2005).

É interessante notar que a malária grave é rara na Amazônia brasileira e a malária cerebral quase inexistente. Por um lado, a imunidade contra malária parece ser adquirida no mesmo prazo de tempo que na África, apesar de estudos quantitativos faltarem neste sentido. Porém, em muitas áreas endêmicas prevalece uma baixa transmissão, e a mais intensa começa apenas na adolescência ao contrário do que se encontra na África, onde há transmissão ativa desde o início da vida (CAMARGO et al., 1994; DA SILVA-NUNES, M. & FERREIRA, 2007).

Uma grande diferença da África para a Amazônia, porém, reside na diversidade antigênica observada dos parasitas que pode levar a um reconhecimento acelerado de repertórios globais de parasitas circulantes numa área. De fato já foi demonstrado que o repertório de genes “*var*” dos isolados da Amazônia é mais limitado do que o de outras regiões (ALBRECHT et al., 2006). Por outro lado, ao contrário do que ocorre na África, parece não haver um reconhecimento diferencial de domínios DBL (Duff Binding-Like) entre soros de

pacientes sintomáticos e assintomáticos e no total a reatividade de muitos soros da área endêmica brasileira parece muito mais baixa que na África (FRATUS, 2008). Isto coloca em dúvida se PfEMP1 é realmente um alvo decisivo na aquisição de uma imunidade protetora contra sintomas da malária, sugerindo que a resposta anti-PfEMP1 não deve ser o único fator determinante.

Apesar de existirem muitos artigos descrevendo a resposta humoral contra um número de antígenos do parasita, predominantemente da forma merozoíta, a definição contra qual antígeno a resposta seria protetora é pouco clara (revisado por WIPASA et al., 2002). Por exemplo, existem antígenos que são mais reconhecidos por indivíduos protegidos contra malária sintomáticos que por indivíduos suscetíveis. Um bom exemplo é a proteína MSP1 contra qual indivíduos assintomáticos muitas vezes desenvolvem uma resposta forte (POLLEY, 2003) (KONING-WARD et al., 2003) e que quando imunizado em macacos, confere proteção contra infecção (SIDDIQUI et al., 1987). Entretanto ensaios em seres humanos utilizando a proteína recombinante alcançaram apenas sucesso parcial (OGUTU et al., 2009).

Além de dados sobre o reconhecimento do principal antígeno variante da superfície da hemácia infectada (PfEMP1), existem poucas informações sobre quais proteínas da superfície de hemácias infectadas, são diferencialmente reconhecidas por indivíduos protegidos ou suscetíveis (HVIID & STAALSOE, 2004).

Na Amazônia existe uma situação especial caracterizada pela escassez de cepas com repertório de antígenos variantes profundamente diferentes (ALBRECHT et al., 2010, GRIFFING et al., 2011). A situação de baixa variabilidade de cepas circulantes na Amazônia facilita a possível identificação de estruturas alvos que na África seriam extremamente polimórficos, além de auxiliar em estudos a respeito do papel da resposta humoral contra a hemácia infectada na proteção de evoluções

sintomáticas ou mesmo graves da malária direcionada ou não, contra proteínas variantes.

Ainda não foram realizados estudos que visem à identificação em larga escala de antígenos da hemácia infectada relacionados com proteção aos sintomas da malária. Portanto, propusemos a seguir a utilização de uma abordagem proteômica de alta sensibilidade para a identificação de proteínas de *P. falciparum* que sejam reconhecidas diferencialmente por anticorpos presentes nos soros de indivíduos sintomáticos e assintomáticos oriundos da Amazônia.

1.5 – ELETROFORESE

A eletroforese é extremamente usada em estudos proteômicos pelo fato de ser capaz de separar centenas ou milhares de proteínas simultaneamente e por apresentar elevada resolução. Além disso, ela é compatível com várias técnicas de determinação das proteínas capazes de efetuar o sequenciamento e identificação. Por estas razões, as principais características da eletroforese serão citadas.

Esta técnica foi introduzida por Tiselius em 1933, tendo como principal interesse a separação de frações protéicas do soro humano em um meio líquido (formado por uma solução-tampão na ausência de sistema estabilizante). Para isso, foi usado um recipiente na forma de "U" contendo na parte superior de cada um dos compartimentos um eletrodo (ânodo e cátodo). Neste aparato, as proteínas migravam a partir da parte central de cada um destes compartimentos. O perfil eletroforético ao longo do tubo era determinado pelo gradiente do índice de refração, visto que o mesmo variava de forma diretamente proporcional à concentração das proteínas. Este sistema apresentava falta de resolução e ausência de estabilização das proteínas separadas devido à rápida difusão (GOMEZ-ARIZA, et al., 2005).

A partir do sistema proposto por Tiselius, no final da década de 1940, surgiu a eletroforese em papel e no início de 1950, a eletroforese em gel de amido e de acetato de celulose. Já no começo dos anos 1960 foi criada a eletroforese em gel de poliacrilamida (esta última será enfatizada posteriormente). Os avanços desta técnica continuaram e nos anos 1990 ocorreu a implementação definitiva da eletroforese capilar (SZPUNAR, 2004; GOMEZ-ARIZA, et al., 2005).

A eletroforese, independente do tipo, é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um meio sob a influência de um campo elétrico contínuo (GOMEZ-ARIZA, et al., 2005). Do ponto de vista eletroforético, as propriedades mais importantes das proteínas são a massa molar, a carga e a conformação. Estes fatores são os que influenciam diretamente na velocidade de migração (v) e na mobilidade (μ) das mesmas ao longo da corrida eletroforética, podendo ser citados, ainda, o campo elétrico aplicado e a viscosidade do meio (SZPUNAR, 2004). As proteínas que possuem velocidades de migração diferentes são separadas uma das outras. A velocidade de migração é definida de acordo com a equação matemática que se segue:

$$v = \mu \times E, \text{ onde } \mu = z e / 6 \pi \eta r.$$

sendo E o campo elétrico aplicado, z a carga da molécula, e a carga elementar ($1,602 \times 10^{-19}$ C), η a viscosidade eletroforética do meio e r o raio da molécula (SZPUNAR, 2004).

1.5.1 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Estão disponíveis vários suportes pelos quais a eletroforese pode ser realizada, tais como: papel ou acetato de celulose, sílica, alumina ou celulose, além de gel de agarose e poliacrilamida. Dentre eles, destaca-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, do inglês, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) por ser um material quimicamente inerte, transparente e estável sobre uma ampla faixa de pH, temperatura e força-iônica (SZPUNAR, 2004; GOMEZ-ARIZA, et al.,2005). Este gel é formado pela copolimerização entre acrilamida e N,N'-metilenobisacrilamida, na presença de persulfato de amônio e tetrametiletenodiamina (TEMED). O tamanho dos poros do gel depende da concentração de bisacrilamida. Quanto maior a proporção de bisacrilamida, menor o tamanho dos poros (SOUZA et al.,2001; BUTCHER et al.,2003; SZPUNAR, 2004). A concentração de bisacrilamida no gel é um fator importante para otimizar a separação das proteínas. Géis com poros largos são adequados para a separação de proteínas grandes, porém, são inapropriados para resolver pequenos peptídeos.

As primeiras corridas eletroforéticas conduzidas em géis de poliacrilamida polimerizados em placas usavam o gel denominado fracionador ou de separação. Depois, foi inserido no sistema, o gel denominado concentrador ou empilhador que possuía poro mais largo. Aproveitando estas características, foi introduzido o sistema descontínuo, que varia a porosidade dos géis, bem como a composição química e o pH das soluções tampão constituintes de cada gel. No sistema descontínuo, os íons tamponantes do gel (Tris-HCl) são diferentes daqueles do reservatório do eletrodo (Tris-Glicina). Dependendo das proteínas, a escolha da solução-tampão e do pH deve ser feita experimentalmente. Esta técnica descontínua possui elevado grau de resolução, apresentando bandas bastante estreitas

(BUTCHER et al.,2003; SOUZA et al., 2001). Estas bandas surgem por causa das diferenças nas velocidades pelas quais as proteínas migram ao longo do gel devido à sua relação carga/massa e sua forma. As bandas são reveladas por meio de processos de coloração específicos. Sabendo-se a distância entre as bandas pode-se estimar as suas massas molares por meio de padrões empregados nas mesmas condições eletroforéticas da amostra em questão.

A eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser classificada como sendo em uma (1D) ou em duas (2D) dimensões.

1.5.2 – ELETROFORESE EM UMA DIMENSÃO (1D-PAGE)

Na eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão, pode-se analisar a proteína na forma nativa ou desnaturada, dependendo das condições empregadas durante a extração das proteínas. No primeiro caso, não há alterações na conformação, atividade biológica e entre as subunidades das proteínas. Este sistema é denominado não dissociante ou nativo e as proteínas são separadas com base na sua carga, usando o método de focalização isoelétrica (IEF, do inglês *Isoelectric Focusing*), ou então, em gel vertical sem SDS. Durante a IEF é formado um gradiente de pH e as espécies carregadas movem-se pelo gel até alcançar um pH específico. Neste pH as proteínas apresentam carga efetiva nula (conhecido como pI da proteína). A IEF apresenta elevada resolução, capaz de separar macromoléculas com diferenças de pI de apenas 0,001 unidade de pH (SZPUNAR, 2004; GAO et al., 2003).

Em sistemas dissociantes ou desnaturantes, as proteínas são solubilizadas em tampão contendo reagente usado para promover a desnaturação das proteínas, sendo geralmente empregado o SDS. Este detergente interage com as proteínas

forneendo lhes cargas negativas. A magnitude da carga negativa está relacionada com a massa molar da proteína. Para um grande número de proteínas, a quantidade de SDS que interage com as cadeias polipeptídicas é da ordem de 1,4 g de SDS por grama de proteína. Nestas condições, todas as proteínas migram em direção ao eletrodo positivo e são separadas somente pelas diferenças relacionadas à massa molar. Além disso, a adição de reagentes redutores como o b-mercaptoetanol e o DTT rompem as pontes de dissulfeto presentes, facilitando o acesso do SDS às partes mais internas das proteínas (BUTCHER et al., 2003; SZPUNAR, 2004; GOMEZ-ARIZA, et al 2005). Este tipo de eletroforese é conhecido como SDS-PAGE devido à combinação entre o tratamento da proteína com SDS e a eletroforese com gel de poliacrilamida. A SDS-PAGE foi originalmente descrita por Laemmli, em 1970. Esta técnica é extensamente empregada para a determinação da massa molar de polipeptídeos presentes em amostras protéicas (LAKOWICZ, 1999).

1.5.3 – ELETROFORESE EM DUAS DIMENSÕES (2D-PAGE)

A eletroforese bidimensional (2D) foi inicialmente desenvolvida por O'Farrel e Kloise em 1975. A metodologia original consistia na preparação de géis cilíndricos de poliacrilamida, em que um gradiente de pH era estabelecido por meio de uma pré-corrída com anfóteros específicos (também chamados de anfólitos), que apresentam alta capacidade tamponante em pHs próximos aos seus pontos isoelétricos (pIs). As proteínas eram, então, submetidas a uma focalização isoelétrica (IEF – *Isoelectric Focusing*) e, posteriormente, a uma eletroforese na presença de SDS, por meio de um sistema convencional descrito por Laemmli (1970). Dessa forma, as proteínas eram separadas na primeira dimensão de acordo com seus pIs (IEF) e na segunda dimensão em função de sua massa molecular (SDS-PAGE).

Apesar de engenhosa, a metodologia era muito trabalhosa, demorada, difícil de ser reproduzida em diferentes laboratórios e dependia da habilidade do pesquisador para obtenção de resultados consistentes (PANDEY & MANN, 2000). Atualmente, muitos desses problemas foram resolvidos com o desenvolvimento de novas tecnologias. Um avanço importante que contribuiu para o aumento da reprodutibilidade da eletroforese 2D foi o desenvolvimento dos géis em forma de tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG - *immobilized pH gel*) (GÖRG et al., 1985).

As tiras são feitas pela copolimerização da acrilamida com o reagente *Immobiline™* (Amershan Biosciences/GE Healthcare), que contém grupos tamponantes ácidos e básicos. Outro avanço importante foi o aperfeiçoamento dos métodos de preparação de amostras protéicas, os quais consistem das seguintes etapas: (1) a extração, usando-se diferentes tampões para amostras específicas; (2) a precipitação, para concentrar as proteínas e eliminar as substâncias interferentes, e (3) a solubilização destas proteínas. No que se refere às duas últimas etapas, a precipitação das proteínas a -20°C com ácido tricloroacético (TCA) a 10% em acetona (DAMERVAL et al., 1986), seguida pela solubilização das proteínas em um meio com altas concentrações de uréia (8,0 - 9,5M) ou uma combinação de uréia 5 - 7M com tiouréia 2M (RABILLOUD et al., 1997), tem sido amplamente utilizada para obtenção de extratos protéicos totais, principalmente em tecidos vegetais e microorganismos. Na presença de altas concentrações de uréia, a tiouréia adquire uma eficiente ação caotrópica, aumentando, portanto, a solubilidade das proteínas de membranas. Além disso, a descoberta de novos detergentes não iônicos, tais como os surfactantes CHAPS e SB 3-10, usados juntamente com agentes redutores adequados para a IEF, como ditioneitol (DTT) e tributilfosfina (TBP) têm fortemente

contribuído para a solubilização de um maior número de proteínas a serem separadas na eletroforese 2D (HERBERT, 1999). A partir daí, a eletroforese 2D (Figura 6) passou a ser a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massa. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análises de expressão gênica por meio da comparação dos padrões protéicos.

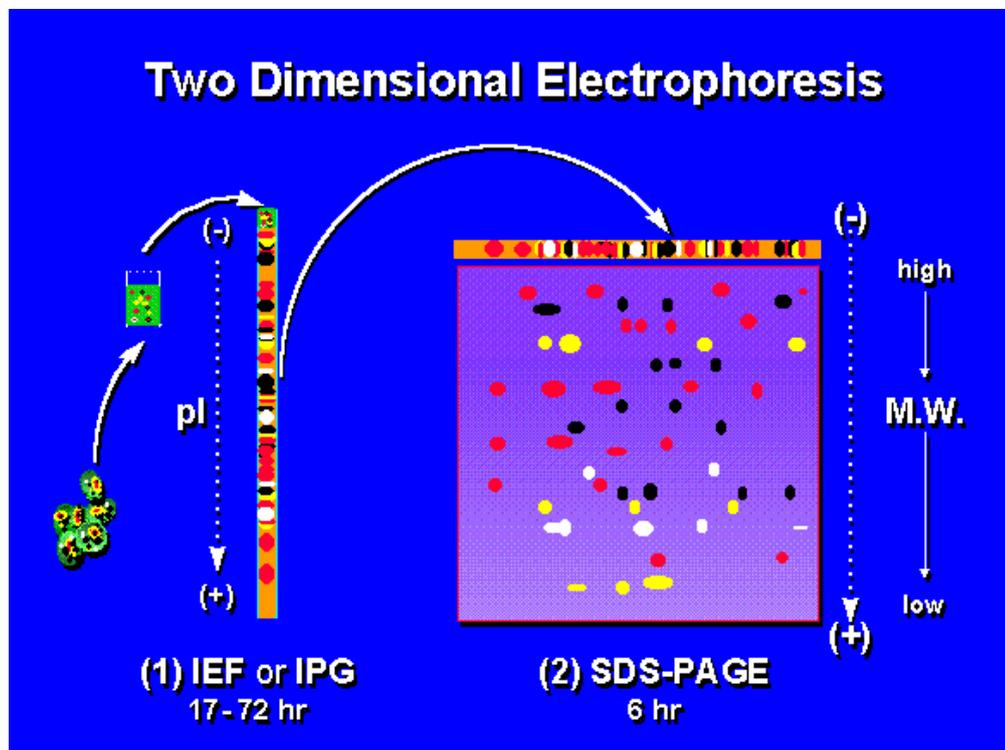


Figura 6: Esquema representativo de uma eletroforese bidimensional. FONTE: GALDOS, 2009.

Entretanto, é importante ressaltar que devem ser tomados alguns cuidados adicionais no preparo da amostra ao se tratar da eletroforese 2D-PAGE. Os problemas que podem ocorrer estão relacionados à presença de componentes que afetem a migração das proteínas. Um exemplo é a alta concentração de sais (acima de 100 mM) que podem interferir na IEF. A adição de DTT em quantidade inadequada na amostra também pode atrapalhar a IEF pelo fato de o mesmo também

migrar pelo gradiente de pH, provocando a reoxidação dos grupos sulfidrilas e ocasionando a precipitação de algumas proteínas. Já as amostras contendo uréia não devem ser aquecidas acima de 37°C para evitar a formação de isocianato, que induz a carbamilação das proteínas. Na carbamilação, os resíduos de lisina modificam-se induzindo alterações no pI das proteínas (GAO et al., 2003).

Apesar de a eletroforese bidimensional ser amplamente utilizada, ela apresenta algumas limitações para proteínas hidrofóbicas, proteínas básicas e que possuam massas molares muito elevadas ou muito baixas (SZPUNAR, 2004). Com base nestas dificuldades, algumas estratégias para se identificar um maior número de proteínas foram propostas: o pré-fracionamento das amostras por meio de extrações sequenciais, o estudo do proteoma organelar em frações subcelulares, a utilização de tiras com faixas estreitas de pH e a sobreposição destes, além de técnicas de colorações específicas utilizando reagentes fluorescentes, radioativos ou imunquímicos (GÖRG et al., 2000; HERBERT et al., 2001).

1. 6 – A TÉCNICA DE WESTERN BLOT

Western blot, ou “*imunoblot* protéico”, é uma técnica analítica usada para detectar proteínas específicas numa amostra de homogenato (células trituradas) ou extrato de tecido biológico.

Primeiramente é executado um gel de eletroforese sobre a amostra, que separa ou desnatura as proteínas de acordo com o tamanho do seu polipeptídeo (condições de desnaturação) ou pela estrutura 3D da proteína (condições de não-desnaturação). Depois as proteínas são transferidas para uma membrana, tipicamente de nitrocelulose ou fluoreto de polivinilideno (PVDF), onde elas são

detectadas usando anticorpos específicos referentes às proteínas que se pretendam identificar (TOWBIN et al., 1979; RENART et al., 1979).

O método teve origem no laboratório de George Stark em Stanford e o nome de *Western Blot* foi dado por W. Neal Burnette (BURNETTE, 1981) e é um trocadilho com o nome do método *Southern Blot*, uma técnica usada para a detecção de DNA desenvolvida por Edwin Southern. Existem também outros 2 métodos similares, o *Northern Blot* (detecção de RNA) e o *Eastern Blot* (detecção de modificações pós-translacionais na proteína).

O método de *Western Blot* é usado nas áreas da biologia molecular, bioquímica, genética, entre outros onde se pretendam correlacionar quantificações de proteínas.

2 – OBJETIVO

Implantar metodologia através da proteômica e imunoquímica para identificar proteínas relevantes na membrana de hemácias infectadas com *P. falciparum* responsáveis pelo desenvolvimento de imunoproteção em indivíduos assintomáticos.

3 – METODOLOGIA

3.1 – OBTENÇÃO DOS SOROS

Os soros utilizados no presente estudo foram obtidos do Laboratório de Epidemiologia do IPEPATRO-CEPEM-FIOCRUZ Rondônia, coletadas em áreas rurais e ribeirinhas do município de Porto Velho (KATSURAGAWA, 2010). Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical) sob Processo N°. (CEP/CEPEM 070/08).

3.2 – CULTIVO DO PARASITA *Plasmodium falciparum* CEPA 3D7

A cepa padrão, 3D7 de *P. falciparum* foi cultivada *in vitro* e mantida em cultura, após o descongelamento, com hematócrito 4% de acordo com a técnica de Trager e Jensen (1976), modificada por Trager (1990). Realizou-se o cultivo em meio completo composto por RPMI 1640 suplementado com 10% de plasma humano desfibrinado A+ ou AB+; HEPES 22,8 mM; glicose 11,1 mM; hipoxantina 0,36 mM (50 µg/mL); NaHCO₃ 23,8 mM, e gentamicina 40 µg/mL.

As culturas de parasitas foram mantidas em estufa a 37°C, condicionadas em garrafas plásticas de 25 cm³ sob uma tensão de gases (5% de O₂ + 5% de CO₂ + N₂ balanceado) ou no dissecador a vela segundo a técnica de Trager (“*candlejar*”).

O acompanhamento do desenvolvimento do plasmódio foi realizado por meio da preparação de esfregaço delgado em lâminas para análise em microscópio

óptico. Os esfregaços foram corados com Giemsa (LUZ & FERNANDEZ-RAMIREZ, 1990; LIMA, et al., 2001), e observados em aumento de 1000X sob imersão.

A sincronização dos parasitas foi realizada utilizando-se intermitentemente flotação de hemácias com formas maduras seguido de exposição a 5% Sorbitol (LJUNGSTRÖM et al., 2008).

3.3 – EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANAS DE HEMÁCIAS NÃO-INFECTADAS E INFECTADAS

As hemácias (3 mL) não-infectadas ou infectadas foram lisadas segundo um protocolo publicado por Rabilloud e colegas (RABILLOUD et al., 1999). Em breve, 12 mL de solução de lise hipotônica [RPMI 1640 diluído 5 vezes e 2% de inibidor de protease (v/v) (*Protease inhibitor Cocktail* da Roche)]. Após 1 minuto sob leve agitação, a solução foi centrifugada a 15.294 g por 5 minutos. Feito isso, observou-se a formação de uma substância branca gelatinosa (*ghost*) nas duas amostras e uma substância escura (*pellet* do parasita) ao fundo do recipiente, somente para hemácias infectadas. O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se novamente a mesma solução de lise (12 mL), repetindo-se esta etapa até o desaparecimento de todo pigmento vermelho (hemoglobina). O *ghost* foi separado em alíquotas. As proteínas presentes no *ghost* foram quantificadas pelo método de Bradford e solubilizadas em detergentes específicos para os métodos nos quais, as mesmas foram separadas, SDS-PAGE ou Eletroforese 2D (RABILLOUD et al., 1999).

3.4 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação da concentração de proteínas totais presentes nos extratos protéicos das amostras foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976). E expressa utilizando-se a albumina de soro bovino como padrão. Para isso, criou-se uma curva analítica de calibração na faixa de concentração entre 5 a 50 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$, com o mesmo tampão usado nas diluições das amostras.

Para as medidas espectrofotométricas, alíquotou-se a amostra em uma cubeta juntamente com reagente de Bradford na proporção de 1:10 (v/v). O reagente de Bradford consiste em uma mistura de azul de Coomassie G-250 a 0,01% (m/v), 4,75% (v/v) de etanol e 8,5% (v/v) de ácido fosfórico. Após 5 minutos de reação, determinou-se a absorbância das amostras em 595 nm, usando espectrofotômetro UV/Vis.

3.5 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As proteínas presentes nas amostras foram previamente solubilizadas em uma solução detergente [2% de Triton X-100 (v/v), e 1% de SDS (m/v)]. O solubilizado foi misturado na razão de 1:1 (v/v) com tampão de corrida (100 mM de Tris-HCl pH 6,8 contendo 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol, DTT e 20% de glicerol). A mistura foi aquecida em banho-maria a 75°C por 15 minutos para serem aplicadas em SDS-PAGE a 10%. Para isso, aplicou-se 20 μL de extrato protéico contendo 200 μg de proteínas em um gel descontínuo com dimensões de 10,1 x 7,3 x 1,0 mm.

O sistema foi formado por gel concentrador a 3,5% (m/m) de acrilamida e tampão de Tris-HCl a 1 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$ (pH=6,8) e gel separador a 10% (m/m) de acrilamida e tampão de Tris-HCl a 1,5 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$ (pH=8,8). As condições eletroforéticas como pH,

força iônica e tampão foram as mesmas estabelecidas por Laemmli (1970). A solução de tampão de corrida empregada no preenchimento dos reservatórios da cuba foi formada por $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ de Tris-Base, $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicina e 0,15% (m/v) de SDS (GE, 2004). Na corrida eletroforética foi fixada uma corrente de 15 mA por gel e potência 5 W aplicado no gel até que o fronte houvesse percorrido todo o gel (GE, 2004).

Realizou-se a corrida eletroforética mantendo-se a temperatura entre 10-15°C para evitar distorções das bandas, e, conseqüentemente, problemas de resolução. A fim de comparação, a cada corrida eletroforética foram colocados 5 µL do Padrão de Peso Molecular – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range (7-175 kDa)* BioLabs.

Ao término da eletroforese, o gel foi lavado com água deionizada durante 5 min para a remoção do excesso de SDS. Em seguida, o mesmo foi corado durante 2 h, sob leve agitação, usando solução de azul de Coomassie G-250 a 1% (m/v) preparado com 45% (v/v) de metanol, 45% (v/v) de água deionizada e 10% (v/v) de ácido acético glacial. O excesso de azul de Coomassie G-250 é removido utilizando solução denominada descorante, composta por água deionizada, metanol e ácido acético glacial na mesma proporção citada acima. Esta solução foi trocada de hora em hora, até a possível visualização apropriada das bandas de proteínas (adaptado de NEUHOFF et al., 1988). Depois das etapas de coloração e descoloração, as imagens dos géis foram capturadas por meio de *Image Scanner* (Amersham Bioscience).

3.6 – OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A SEPARAÇÃO POR 2D-PAGE

Para a eletroforese bidimensional usa-se normalmente uma série de substâncias e procedimentos para obter uma separação eficiente, que são, normalmente, distintos daqueles empregados na eletroforese em uma dimensão. Por este motivo, é necessário efetuar uma investigação mais detalhada das condições do preparo da amostra a fim de se alcançar um maior número de proteínas separadas em um único gel. Desta forma, busca-se alcançar o melhor procedimento para remoção de interferentes presentes na amostra.

Neste trabalho, a amostra foi purificada utilizando-se a técnica de precipitação de proteínas através de um kit de purificação, *2-D Clean-Up kit*, da empresa GE. A concentração de proteína presente após a precipitação foi determinada utilizando o método de Bradford e a amostra foi re-suspendida em tampão de re-hidratação pH 3-10 Não Linear (7M de Uréia, 2M de Tiouréia, 2% de Triton X-100 (v/v), 1% de IPG *Buffer* (v/v) e DTT) (GE, 2004).

3.7 – SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM DUAS DIMENSÕES (2D-PAGE)

Na presente etapa, as proteínas foram separadas pelo ponto isoelétrico em fitas de 13 cm com valores de pH variando entre 3 a 10 de forma não linear. Estas fitas contêm gel de poliacrilamida, onde o gradiente de pH é formado pela presença de anfólitos (GE, 2004). Para a re-hidratação das fitas, aplicou-se 250 μ L de amostra (400 μ g de proteínas mais solução de re-hidratação) em uma canaleta do aparato sobre o qual as fitas foram colocadas.

O gel das fitas foi re-hidratado a temperatura ambiente por cerca de 12 horas. Após este período, levou-se as fitas ao sistema focalizador nas seguintes condições: (1) passo de 500 V até acúmulo de 500 Vh, (2) gradiente de 500 a 1000 V até

acúmulo de 800 Vh, (3) gradiente de 1000 a 8000 V até acúmulo de 11300 Vh e (4) passo de 8000 V até acúmulo de 3000 Vh (GE, 2004). Em média, o programa foi executado durante 5,5 h, porém o tempo da última etapa pode ser prolongado, caso, durante a execução do programa inicial, a amostra não tenha atingido o final da fita, este fato foi observado pela linha de azul de bromofenol.

Ao término da focalização, as fitas foram equilibradas em duas etapas. Na primeira delas, utilizou-se 10 mL da solução contendo 6 mol.L⁻¹ de uréia, 2% de SDS (m/v), 30% de glicerol (v/v), 50 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl a 1,5 mol.L⁻¹ (pH=8,8), 0,002% de azul de bromofenol e 1% de DTT (m/v) para cada fita. Na segunda etapa, utilizou-se a mesma solução, porém, neste caso, substituiu-se o DTT por 2,5% de iodoacetamida (m/v) (GE, 2004). Cada etapa de equilíbrio da fita foi executada por 15 minutos, sob leve agitação.

Em seguida, aplicou-se as fitas em géis de poliacrilamida a 10% previamente preparado em placa de 180 x 160 x 1,0 mm. Adicionou-se sob um pequeno pedaço de papel de filtro, 10 µL de padrão de massa molar. Após ser acomodada apropriadamente cada fita e o padrão sob o gel de poliacrilamida, foi adicionada uma solução aquecida (ca. 40°C) de 0,5% de agarose (m/v). Desta forma, a agarose, ao ser polimerizada, proporcionou um contato efetivo entre a fita e o gel, evitando, assim, o aparecimento de bolhas de ar (ROCHA et al., 2005).

A separação das proteínas, de acordo com a massa molecular, foi realizada aplicando-se 25 mA por gel e 100 W durante aproximadamente 5,5 h. Depois deste período, lavou-se o gel com água deionizada. Em seguida, as proteínas foram fixadas utilizando uma solução contendo ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v) durante 1 hora. Removeu-se a solução fixadora e lavou-se o gel novamente com água deionizada durante 10 minutos, sob agitação, por 3 vezes.

Revelou-se as proteínas presentes em um dos géis utilizando-se coloração com solução de Nitrato de Prata (BLUM et al., 1987). Por fim, escaneou-se o mesmo, com equipamento *Image Scanner* (Amershan Bioscience).

3.8 – WESTERN BLOT

Após a amostra ser submetida à SDS-PAGE, as proteínas do gel não corado, foram transferidas para uma membrana de PVDF de poro tamanho 0,45 µm, em um aparato de transferência semi-seco. Esse método é indicado por possibilitar uma rápida e total transferência das proteínas. O protocolo de transferência foi realizado de acordo com os seguintes passos:

- Cortou-se uma membrana de PVDF e 4 folhas de papel absorvente ligeiramente maiores que o gel de separação, sendo o gel concentrador desprezado;
- Sobre o ânodo do aparelho de transferência semi-seco (*Semi-Dry transfer unit*, GE), foram colocadas 2 folhas de papel embebidas em tampão de transferência pH 8.8 [0,06 mol.L⁻¹ de Tris-Base, 0,5 mol.L⁻¹ de glicina, 0,15% de SDS (m/v) e 20% de metanol (v/v)] e, sobreposta a estas, a membrana de PVDF, igualmente embebida em tampão de transferência;
- Sobre a membrana colocou-se o gel e, por fim, duas folhas de papel absorvente embebidas em tampão;
- O sistema montado foi cuidadosamente pressionado de modo a retirar bolhas de ar que eventualmente diminuiriam o contacto entre o gel de acrilamida e a membrana; o uso de membranas com poro 0,45 µm evitou a perda de proteínas de baixo peso molecular para as folhas de papel;

- Colocou-se o cátodo; a transferência das proteínas iniciou-se quando aplicada uma corrente constante ao sistema montado. A corrente aplicada foi de 0,8 mA por cm² de gel, sendo, aplicada por 60 minutos.

Decorrido esse tempo, as proteínas foram transferidas dos géis para a membrana de PVDF. As membranas foram então inseridas em solução a 1% de Caseína, misturado a 100 mL (por gel) de PBST [solução fisiológica tamponada com 0,01 M fosfatos, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (v/v)] para o bloqueio das proteínas inespecíficas. Esta solução ficou em contato com a membrana por 12 horas.

Foram então realizadas 4 lavagens de 15 minutos com PBST, sob suave agitação. Procedeu-se à incubação *overnight* com os anticorpos primários – soro de paciente nunca infectado, soro de paciente sintomático infectado, soro de paciente assintomático [diluição inicial de 1:1000 (v/v)]. Em caso de separação por eletroforese 2D, utilizou-se soro de paciente assintomático infectado – sob suave agitação à temperatura ambiente. No dia seguinte, foram realizadas 4 lavagens de 15 minutos e as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários policlonal, anti-IgG humano conjugado a uma peroxidase [1: 10.000, (v/v)], por 2 horas. Após mais 4 lavagens de 15 minutos com PBST, as membranas estavam prontas para detecção.

As proteínas imunorreativas foram visualizadas pela adição de 5 mg do substrato enzimático 3,3'-tetrahydrocloro de diaminobenzidina (DAB) a cada 15 mL de PBS com 1% de H₂O₂. A reação foi interrompida por lavagens em água deionizada. Por fim, a membrana foi documentada no equipamento *Image Scanner* (Amershan Bioscience).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de padronizar metodologia de separação de proteínas de membrana de hemácias infectadas por *P. falciparum* para posterior identificação e, assim, esclarecer o mecanismo pelo qual indivíduos assintomáticos para malária estão relativamente protegidos da doença, este trabalho encontrou proteínas presentes nas membranas de hemácias infectadas por *P. falciparum*, que são imunorreativas aos soros de pacientes assintomáticos e padronizou a metodologia para suas identificações. Para isso, foram realizadas diversas análises.

Como a expressão e exportação de proteínas de membrana de hemácias infectadas por *P. falciparum* ocorrem durante o estágio maduro do parasita (FLORENS et al., 2004), formas maduras de parasitas nos estágios de trofozoíta tardio e esquizontes foram separadas das hemácias não infectadas através de flotação e estas utilizadas para a extração de proteínas de membranas de hemácias infectadas.

Inicialmente realizou-se uma eletroforese monodimensional na qual, proteínas de membranas de hemácias não infectadas e proteínas de membranas de hemácias infectadas por *P. falciparum* foram separadas e coradas com azul de coomassie. O perfil de separação e o número de proteínas presentes nas duas amostras foram comparados e analisados de forma qualitativa. Sendo assim, foi possível observar

(Figura 7) que apesar da pouca diferença entre o perfil de separação das mesmas, existem algumas proteínas que estão presentes na amostra de hemácia infectada (setas) e ausente na amostra de hemácia não infectada.

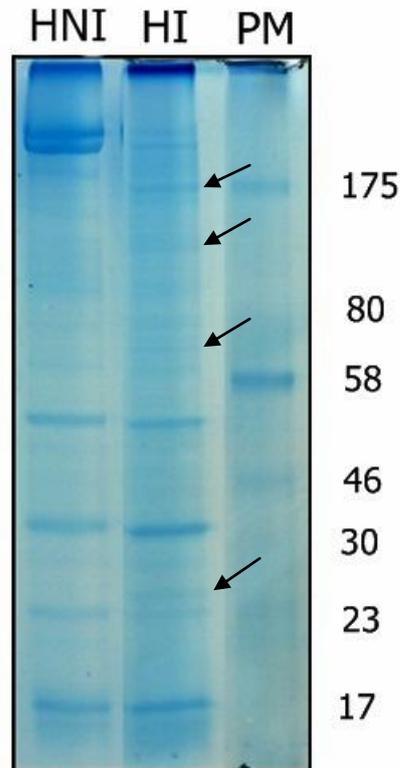


Figura 7: Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% de proteínas de membrana de eritrócito não infectado (HNI) e proteínas de membrana de eritrócito infectado com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range (7-175 kDa) (P7709S)*. O gel foi corado com coomassie blue G-250.

A hemácia humana costuma ser referida como uma simples “bolsa” de hemoglobina, evolutivamente adaptada para realizar as tarefas especializadas de transporte de O₂ e CO₂ (MAIER et al., 2009). Devido à ausência de núcleo e a incapacidade de sintetizar proteínas, em sua fase madura, quando uma hemácia é infectada pelo parasita da malária, o *Plasmodium* passa a promover a produção e exportação de proteínas para além da sua própria membrana plasmática. Estas proteínas podem ser endereçadas a membrana do vacúolo parasitóforo, ao

citoplasma da hemácia e, além disso, serem endereçadas a superfície da membrana do eritrócito (MAIER et al., 2009).

Proteínas exportadas para a membrana do eritrócito são cruciais para a patogenicidade do *P. falciparum*, por exemplo, a KAHRP (*knob associated histidine-rich protein*) (POLOGE et al., 1987; TRIGLIA, 1987) é transportada para a membrana da hemácia infectada onde passa a ser o maior componente dos *knobs*, que ancoram uma das maiores famílias polimórficas de proteínas de membrana integral, conhecida como PfEMP-1 (*P. falciparum erythrocyte membrane protein-1*). Estas proteínas são essenciais para o fenômeno de aderência de eritrócitos infectados ao endotélio vascular, sendo uma das principais causas de mortes relacionadas à malária grave humana (COOKE et al., 2001). Entretanto, PfEMP-1 e KAHRP são apenas duas das diversas proteínas exportadas pelo parasita que interagem com a membrana da hemácia (COOKE et al., 2004).

Além disso, proteínas associadas à membrana desempenham um papel importante em muitos processos fisiológicos fundamentais, incluindo processos de troca e reconhecimento. Tais processos são ativos durante o ciclo celular assexuado do parasita e governam os principais passos do ciclo de vida do *Plasmodium* (MAIER et al., 2009).

O reconhecimento destas proteínas como antígenos pelo sistema imunológico, teoricamente, conferiria ao hospedeiro, proteção contra a infecção pelo parasita. Isto seria possível, por que a hemácia infectada passaria a ser alvo de anticorpos e a sobrevivência do *Plasmodium* estaria ameaçada.

Com base nisso, preparou-se seis (6) géis iguais ao da Figura 7. As proteínas presente nos mesmos foram transferidas para membranas de PVDF, a fim de se realizar a técnica de *western blot*. Os soros utilizados na técnica de *western blot*,

foram selecionados com base em uma triagem realizada pelo Laboratório de Epidemiologia do Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais - IPEPATRO. O Quadro 1 ilustra a relação de soros utilizados nos experimentos e os parâmetros que classificam o paciente como sintomático ou assintomático.

Quadro 1: Parâmetros analisados para classificar um indivíduo em sintomático ou assintomático.

Amostra	ASSINTOMÁTICO	SEXO	NUM DE MALARIA	FEBRE?	CALAFRIO	NAUSEA	VOMITO	DIARREIA	MIALGIA	ARTRALGIA	CEFALEIA	SINTOMAS?	PCR 1	PCR 2	1o REAL TIME 2008
PINSN-01	N	M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
PIPSP-01	N	M	1	S	S	N	N	N	S	S	S	5	-	-	-
PIPSP-02	N	M	2	S	S	S	S	N	S	S	S	7	-	-	-
PIPSN-01	S	M	9	N	N	N	N	N	N	N	N	0	-	PF	PF
PIPSN-02	S	M	99	N	N	N	N	N	N	N	N	0	-	PF	PF
PIPSN-03	S	M	99	N	N	N	N	N	N	N	N	0	PF	PF	PF

*PF = *Plasmodium falciparum*

No primeiro *western blot* realizado (Figura 8), foi utilizado soro de paciente que nunca havia sido exposto à infecção por malária (*naive*). Tal soro foi utilizado para avaliar a possibilidade de alguma proteína da membrana de eritrócito infectado por *P. falciparum* (HI) ser imunorreativa aos anticorpos de um indivíduo, que nunca fora infectado pelo parasita. As proteínas de membrana de hemácia não infectada (HNI) foram utilizadas como controle.

Como pode ser observado na Figura 8, não é possível observar, na amostra de proteínas de hemácias infectadas com *P. falciparum* e no controle, proteínas imunorreativas quando confrontadas com soro de paciente (*naive*). Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por (FONTAINE et al., 2010) que também confrontou os soros de pacientes nunca antes expostos a infecção por malária (n=31) com proteínas de membranas de hemácias infectadas (HI) e proteínas de membranas de hemácias não-infectadas (HNI), obtendo muito poucas proteínas imunorreativas .

Estudos apontam que a aquisição de imunidade naturalmente adquirida no caso da malária, é produto de exposições múltiplas a infecções parasitárias ao longo do tempo (DOOLAN et al., 2009). Com isso, a não ser que o paciente apresente proteção por outros mecanismos, este quando exposto a infecção por *Plasmodium*, provavelmente apresentará sintomas da doença e será considerado sintomático.

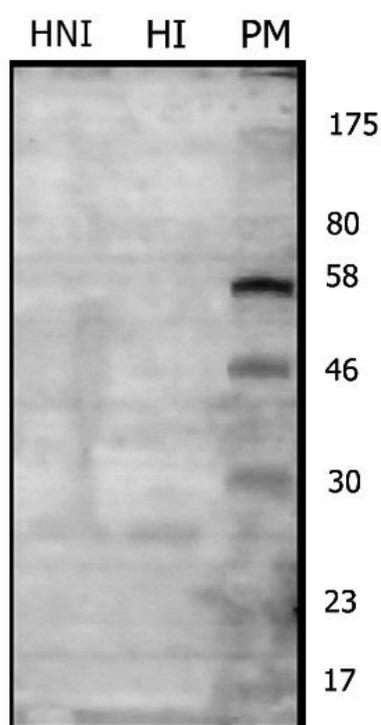


Figura 08: *Western blot* realizado com soro de paciente nunca antes exposto a infecção por *P. falciparum* (PINSN-01), diluição 1:1000. Separação em SDS-PAGE 10% de proteínas de membrana de eritrócito não infectado (HNI) e proteínas de membrana de eritrócito infectado com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range (7-175 kDa) (P7709S)*. Proteínas transferidas para uma membrana de PVDF, poro tamanho 0,45 μm . Proteínas imunorreativas reveladas com DAB.

Após esta análise, realizou-se *western blot* com os soros de pacientes infectados e sintomáticos. Os resultados obtidos, apresentados nas Figuras 9 e 10, demonstram a presença de um pequeno número de proteínas imunorreativas para o soro destes pacientes, entretanto, este número é muito baixo. Na figura 9, é possível observar algumas proteínas de membranas de hemácias infectadas imunorreativas

(apontada pela seta) com perfil de massas compreendido entre 80 e 175 kDa, porém, nenhuma resposta foi observada no controle (HNI). Apesar da resposta contra alguns antígenos, esta não é suficiente para conferir ao paciente proteção, contemplando que os mesmos apresentam sintomas em decorrência da infecção (ver Quadro 1). Nenhuma resposta foi observada no *western blot* da figura 10.

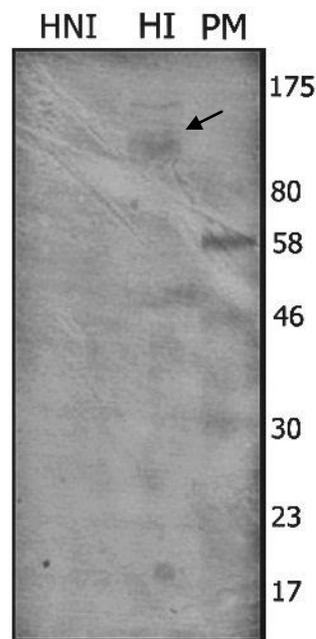


Figura 9: *Western blot* realizado com soro de paciente sintomático e infectado por *P. falciparum* (PIPSP-01), diluição 1:1000. Separação em SDS-PAGE 10% de proteínas de membrana de eritrócito não infectado (HNI) e proteínas de membrana de eritrócito infectado com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range* (7-175 kDa) (P7709S). Proteínas transferidas para uma membrana de PVDF, poro tamanho 0,45 μm . Proteínas imunorreativas reveladas com DAB.

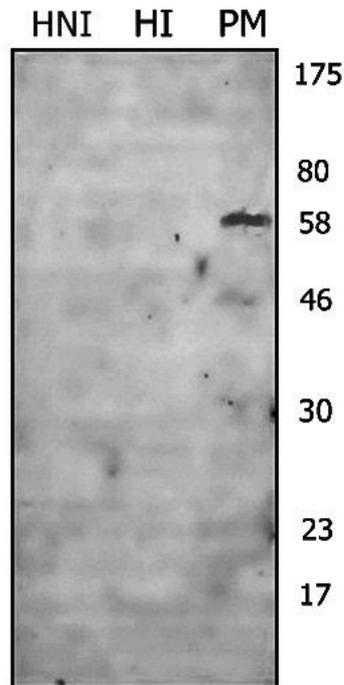


Figura 10: *Western blot* realizado com soro de paciente sintomático e infectado por *P. falciparum* (PIPSP-02), diluição 1:1000. Separação em SDS-PAGE 10% de proteínas de membrana de eritrócito não infectado (HNI) e proteínas de membrana de eritrócito infectado com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range* (7-175 kDa) (P7709S). Proteínas transferidas para uma membrana de PVDF, poro tamanho 0,45 μm . Proteínas imunorreativas reveladas com DAB.

Além disso, estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados por OLESEN e colaboradores (2010), que em seus experimentos confrontou proteínas de membranas de hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* com as subclasses IgG de plasma de pacientes com diferentes níveis de exposição a infecção pelo mesmo. Neste estudo, é possível observar que o número de proteínas imunorreativas ao plasma de pessoas que não apresentavam imunidade clínica, portanto sintomáticos para malária, era baixo.

Após estes resultados, decidiu-se analisar a resposta imunológica apresentada por soros de pacientes que relatavam assintomaticidade para malária. A imagem do *western blot* apresentado na Figura 11, mostra o perfil de resposta imunológico para o soro de um paciente assintomático. Nessa imagem, pode-se

observar que há o aparecimento de várias proteínas imunorreativas quando analisa-se a amostra de HI. O mesmo não é observado para HNI.

Tal fato permite notar que, o sistema imunológico humoral de um indivíduo assintomático, reconhece proteínas de membranas de hemácias infectadas por *P. falciparum*, porém, não reconhece proteínas de membranas de hemácias não infectadas. Além disso, é possível observar um grande número de proteínas na amostra de HI imunorreativas, indicando que estas podem estar intimamente relacionadas ao fator assintomaticidade apresentado por este paciente.

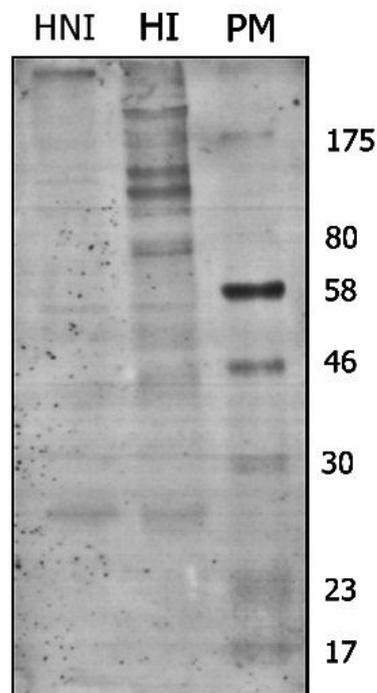


Figura 11: *Western blot* realizado com soro de paciente infectado e assintomático (PIPSN-01), diluição 1:1000. Separação em SDS-PAGE 10% de proteínas de membrana de eritrócito não infectado (HNI) e proteínas de membrana de eritrócito infectado com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range (7-175 kDa)* (P7709S). Proteínas transferidas para uma membrana de PVDF, poro tamanho 0,45 μm . Proteínas imunorreativas reveladas com DAB.

Além disso, testou-se o soro de mais 02 (dois) pacientes assintomáticos para *P. falciparum* (Figuras 12 e 13).

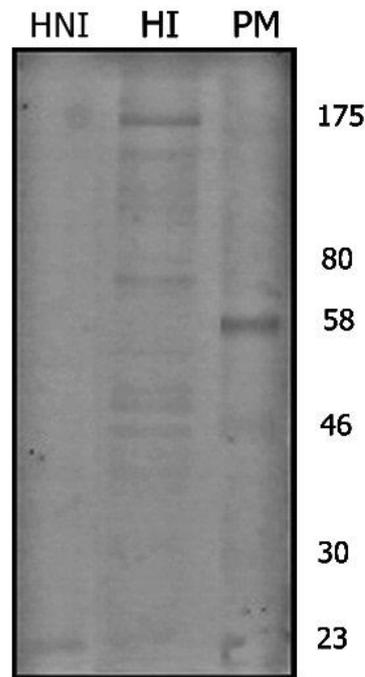


Figura 12: *Western blot* realizado com soro de paciente infectado e assintomático (PIPSN-02), diluição 1:1000. Separação em SDS-PAGE 10% de proteínas de membrana de eritrócito não infectado (HNI) e proteínas de membrana de eritrócito infectado com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range (7-175 kDa) (P7709S)*. Proteínas transferidas para uma membrana de PVDF, poro tamanho 0,45 μm . Proteínas imunorreativas reveladas com DAB.

Com o resultado da Figura 12, é possível observar que o perfil de proteínas imunorreativas da membrana de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (HI) é muito parecido com o perfil de resposta apresentado na figura 11. Isso mostra que a assintomaticidade pode estar relacionada à capacidade do sistema imunológico reconhecer um determinado grupo de proteínas.

Observando-se a figura 13, pode-se notar, novamente, que o perfil de resposta é semelhante a aqueles apresentados anteriormente para indivíduos assintomáticos, entretanto, com maior intensidade, o que proporciona uma melhor visualização das proteínas imunorreativas, e com maior número.

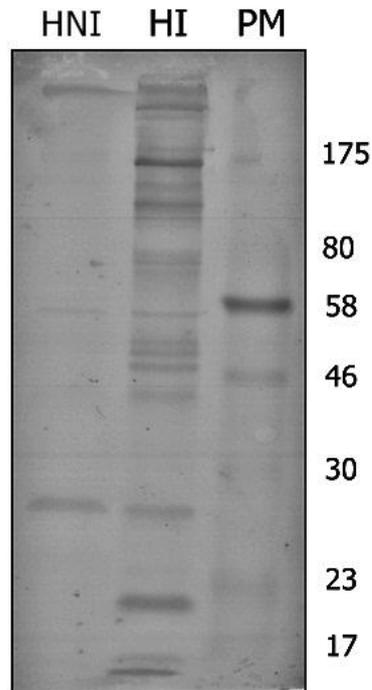


Figura 13: *Western blot* realizado com soro de paciente infectado e assintomático (PIPSN-03), diluição 1:1000. Separação em SDS-PAGE 10% de proteínas de membrana de eritrócito não infectado (HNI) e proteínas de membrana de eritrócito infectado com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range (7-175 kDa) (P7709S)*. Proteínas transferidas para uma membrana de PVDF, poro tamanho 0,45 μm . Proteínas imunorreativas reveladas com DAB.

Ao analisar o perfil de resposta para pacientes assintomáticos, é possível identificar diversas proteínas imunorreativas com massas semelhantes a massas de proteínas de *P. falciparum* exportadas para a membrana do eritrócito. Dentre estas, podemos citar as bandas encontradas na região entre 80 e 175 kDa, que após identificação, talvez sejam proteínas como a RESA (*ring-infected erythrocyte surface antigen*), também conhecida como Pf155, uma proteína de 155 kDa sintetizada no estágio maduro do parasita e liberada para o citosol do eritrócito do hospedeiro onde é fosforilada e encaminhada para a membrana da hemácia (PEI et al., 2007). Também podemos citar a MESA (*mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen*), uma proteína de 168 kDa, fosforilada e está presente em uma localização similar a da RESA, porém, difere desta por ser detectada em um estágio posterior de desenvolvimento do parasita assexuado (COPPEL et al., 1988).

Além dessas, é possível observar uma banda, com intensidade de resposta muito forte e com massa em torno de 175 kDa. Vários trabalhos apontam a importância de uma proteína com essa massa, a EBA-175. Esta é uma proteína do *P. falciparum* que liga-se ao receptor glicoforina A (GpA) durante a invasão do eritrócito (CAMUS & HADLEY, 1985; SIM et al., 1990; ADAMS et al., 1992). A via EBA-175/GpA é dominante na via de invasão resistente a quimiotripsina (DURASINGH et al., 2003). Estudos apontam que anticorpos anti EBA-175 inibem a ligação desta com a GpA e bloqueiam a invasão do merozoíto *in vivo* (SIM et al., 1990; 2001).

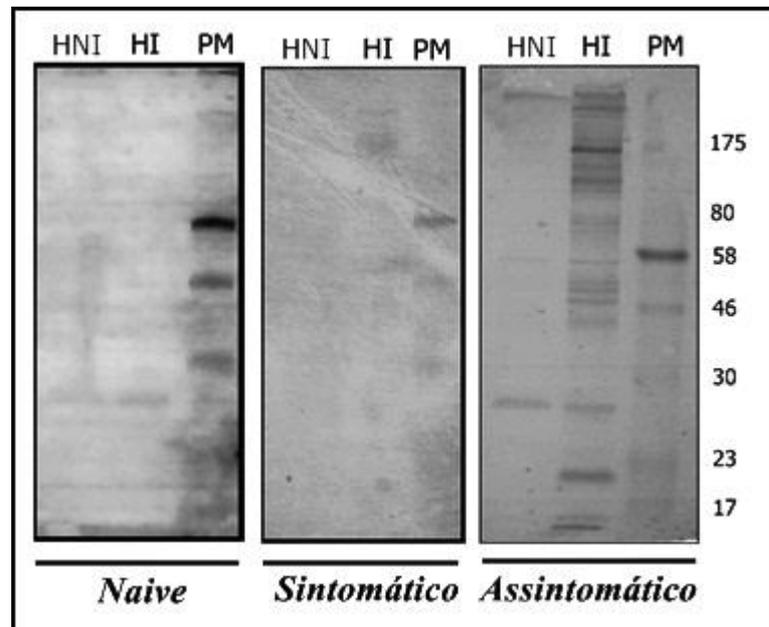


Figura 14: Comparação entre os resultados de imunoreatividade obtidos através de *western blot* para cada um dos três tipos de soros [**Naive** (igual Figura 08), **Sintomático** (igual Figura 09), **Assintomático** (igual Figura 13)].

Uma comparação dos resultados de imunoreatividade obtidos para os três tipos de soros (*naive*, sintomático e assintomático) empregados neste trabalho (Figura 14), possibilita uma melhor visualização do perfil de resposta diferencial apresentado pelo soro de paciente assintomático, demonstrando sua maior capacidade de reconhecimento de antígenos perante os demais soros.

Com os resultados mostrados acima, é sugestivo que a proteção apresentada por indivíduos assintomáticos, esteja associada ao reconhecimento de proteínas presentes na membrana dos eritrócitos infectados. Acredita-se que a classe de anticorpos IgG têm um papel muito importante no reconhecimento dessas proteínas. Estudos demonstram que os níveis de IgG Anti-VSA estão correlacionados com a proteção da malária clínica em Gana (DODOO et al., 2001; OFORI et al., 2002), Quênia (KINYANJUI et al., 2004), Gabão (YONE et al., 2006) e Tanzânia (MAGISTRADO et al., 2007). É interessante notar que no caso em estudo isso não parecer ser diferente. Sendo assim, a identificação dos antígenos envolvidos nesse processo e o papel que cada um desempenha na proteção contra a malária clínica no caso brasileiro, pode contribuir de grande forma na tentativa de encontrar formas de propiciar a disseminação dessa proteção.

Outra questão importante que pode ser solucionada com a identificação destas proteínas é o fato de que há um número muito grande de proteínas imunorreativas presentes na membrana das hemácias infectadas. Isso leva as seguintes perguntas: *Qual a origem dessas proteínas? São todas exportadas pelo parasita para a membrana dos eritrócitos? É possível que proteínas pré-existentes na membrana das hemácias, passem a ser reconhecidas como estranhas pelo sistema imune após a infecção pelo Plasmodium?*

Estima-se que o *Plasmodium falciparum* exporta de 200 a 300 proteínas para a hemácia do hospedeiro (SARGEANT et al., 2006; VAN et al., 2008). Ao fazê-lo, o parasita remodela o citoesqueleto e a membrana plasmática da hemácia, criando os *knobs* de citoaderência, canais para a entrada de nutrientes e alterando a estabilidade mecânica do eritrócito (HALDAR & MOHANDAS, 2007; MAIER et al., 2009). Embora algumas dessas proteínas já terem sido caracterizadas a nível

molecular, grande parte das suas funções permanecem desconhecidas ou incompletamente descritas (Quadro 2).

Apesar do grande número de proteínas exportadas pelo parasita, apenas uma pequena parcela destas, são exportadas para a membrana da hemácia. A grande maioria está localizada em regiões como a membrana do vacúolo parasitóforo e o citoplasma da hemácia. Comparando as estruturas de uma hemácia não infectada com uma hemácia após a infecção (Figura 15), é possível observar a influência dessas proteínas na arquitetura do eritrócito e no arranjo das proteínas pré-existentes na sua superfície.

Observando o eritrócito não infectado é possível notar a presença de heterodímeros de espectrinas compreendendo unidades de repetição ligadas por dobradiças flexíveis, estes podem expandir e dobrar-se em resposta a deformações causadas por estresse. Os dímeros de espectrina são ligados cabeça-cabeça para formar tetrâmeros e em suas caudas são ligados por complexos de junções, compreendendo oligômeros de actina que são estabilizados pela proteína 4.1R e outras moléculas. Interações verticais conectando adequadamente a membrana ao esqueleto adjacente incluem ligação entre Banda-3-Anquirina-espectrina e o complexo ternário entre proteína 4.1R, p55 e glicoforina C (MAIER et al., 2009).

Quadro 2: Características de algumas proteínas exportadas do *P. falciparum*.

Proteína	kDa	Localização	Função
Antígenos Solúveis e Proteínas estruturais			
GBP-130	96	Citoplasma Hemácia	Desconhecida
KAHRP	71	Estrutura membrana da hemácia	Essencial para formação dos knobs, liga-se a espectrina, actina e a porção citoplasmática da PfEMP-1
MESA e PfEMP-2	168	Estrutura membrana da hemácia	Liga-se a proteína 4.1
RESA e Pf155	127	Estrutura membrana da hemácia	Liga-se a espectrina e pode estabilizar a membrana do eritrócito
PfEMP-3	274	Maurer's cleft, Estrutura da membrana hemácia.	Parece estar envolvida no tráfico da PfEMP-1.
HRP2 e ShARP	32	Citoplasma, pode ser secretada da hemácia	Liga-se ao grupo heme; promove a desintoxicação causada pelo heme.
Pf332 e Ag332	689	Associada com Maurer's cleft, Maurer's cleft.	Desconhecida
PfAARP2	166	Citoplasma e possível associação com Maurer's cleft.	Desconhecida
41-2	22	Maurer's cleft	Parecido com Bet3p; pode estar envolvido na fusão das vesículas.
Enzimas e transportadores			
Fatty acyl-CoA sintase-1	95	Citoplasma hemácia	Remodelador de lipídeos
PIGCN20	95	Membrana Vacúolo Parasitóforo, Citoplasma hemácia	Proteína de membrana, transportador de componentes
FEST e Pf255	318	Maurer's cleft, Estrutura membrana da hemácia.	
Maquinaria de tráfico			
PfSar1p	22	Maurer's cleft	Pequena GTPase
PfSec31p	163	Maurer's cleft	Capa protéica
PfSec23p	86	Maurer's cleft	Capa protéica
PfNSF	89	Citoplasma da hemácia e Maurer's cleft.	Componente de fusão da vesícula
Proteínas de Membrana			
EXP1 e CRA	17	Membrana Vacúolo Parasitóforo, Rede Tubovesicular.	Desconhecida
EXP2	33	Membrana Vacúolo Parasitóforo, Rede Tubovesicular.	Desconhecida
PfEMP-1	~246	Maurer's cleft, Estrutura da membrana hemácia e Superfície da hemácia	Citoaderência, envolvido na variação antigênica.
MAHRP	29	Maurer's cleft	Liga-se a heme, pode proteger Maurer's cleft.
PfSBP1	36	Maurer's cleft, Estrutura da membrana da hemácia	Desconhecida
FIFIN e ESTEVOR	37	Citoplasma e Superfície da Hemácia	Possivelmente envolvido na variação antigênica.
PfMC-2TM	35	Maurer's cleft	Sub-família do STEVOR; possivelmente envolvido na variação antigênica.
EXTRAMP e SEP	11	Membrana Vacúolo Parasitóforo, Rede Tubovesicular e Maurer's cleft	Desconhecida
REX	83	Maurer's cleft	Desconhecida
PfAARP1	213	Estrutura membrana da hemácia.	Domínio Multi-transmembrana. Função desconhecida.
Proteínas exportadas para o Vacúolo Parasitóforo			
ABRA	87		Desconhecida
SERA 1-5	81-125		Proteases envolvidas na invasão do parasita
FIRA	190		Desconhecida
GLURP	80		Desconhecida
S-Antigen	63		Desconhecida

Adaptado de COOKE et al., 2004

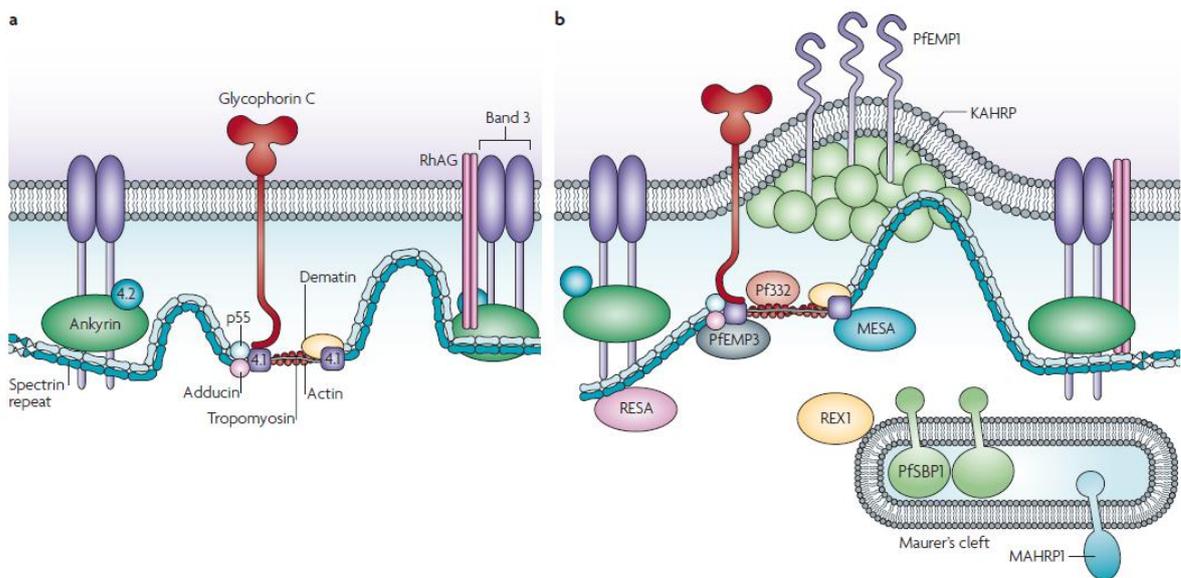


Figura 15: Esqueleto de uma membrana não infectada (a) e infectada com *P. falciparum* (b). (MAIER et al., 2009).

Após a invasão do eritrócito pelo *Plasmodium falciparum*, uma série de alterações ocorre. No estágio de anel o parasita exporta a proteína RESA (*ring-infected erythrocyte surface antigen*) que se associa com a espectrina e estabiliza o esqueleto da membrana. Já na forma madura, moléculas de KAHRP associam-se para formar uma estrutura cônica que interage com a espectrina. Pf332 e MESA (*mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen*) ligam-se a um complexo de junção enquanto que a PfEMP3 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 3*) se liga a espectrina, comprometendo ainda mais a deformabilidade da membrana da hemácia (MAIER et al., 2009).

A proteína mediadora da citoaderência PfEMP1 é concentrada na região dos *knobs* através da interação do seu domínio citoplasmático com a KAHRP. O domínio amino-terminal da PfEMP1 está exposto na superfície extracelular onde pode interagir com receptores celulares do hospedeiro e mediar a citoaderência. As proteínas derivadas do parasita e ligadas a membrana dos *Maurer's clefts* estão envolvidas no tráfico da PfEMP1.

A formação e arquitetura das organelas são controladas por proteínas residentes, tais como, REX1 (*ring exported protein*), MAHRP1 (*membrane-associated Histidine-rich protein 1*) e PfSBP1 (*P. falciparum skeleton binding protein 1*). Estas estão ligadas a membrana do eritrócito por estruturas semelhantes a cordas (MAIER et al., 2009).

Com base no exposto acima, acredita-se que, devido às alterações causadas pelo parasita na arquitetura da hemácia infectada, não seria surpresa encontrar proteínas pré-existentes na membrana do eritrócito sendo reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro após a infecção, tendo em vista que estas alterações podem causar mudanças na conformação espacial dessas proteínas. Estudos recentes demonstram o reconhecimento de proteínas da membrana do hospedeiro como imunorreativas e apontam a necessidade de uma melhor compreensão do mecanismo pelo qual isso acontece (FONTAINE et al., 2010; 2011). Sendo assim, é imprescindível a caracterização dessas proteínas como tentativa de elucidar essa questão.

Entretanto, a identificação de proteínas é um processo complicado que requer uma boa purificação, ou seja, as proteínas devem ser bem separadas para que não haja dúvida no momento da identificação. Nesse sentido, a técnica utilizada neste trabalho para separar e preparar as proteínas de membrana de eritrócitos infectados por *P. falciparum* para uma posterior identificação, foi a eletroforese 2D.

A separação bidimensional das amostras revelou um grande número de proteínas presentes nas duas amostras, HNI e HI (Figuras 16 e 17). Tal fato demonstra que o poder de resolução desta técnica é muito maior do que aquele apresentado pela eletroforese unidimensional.

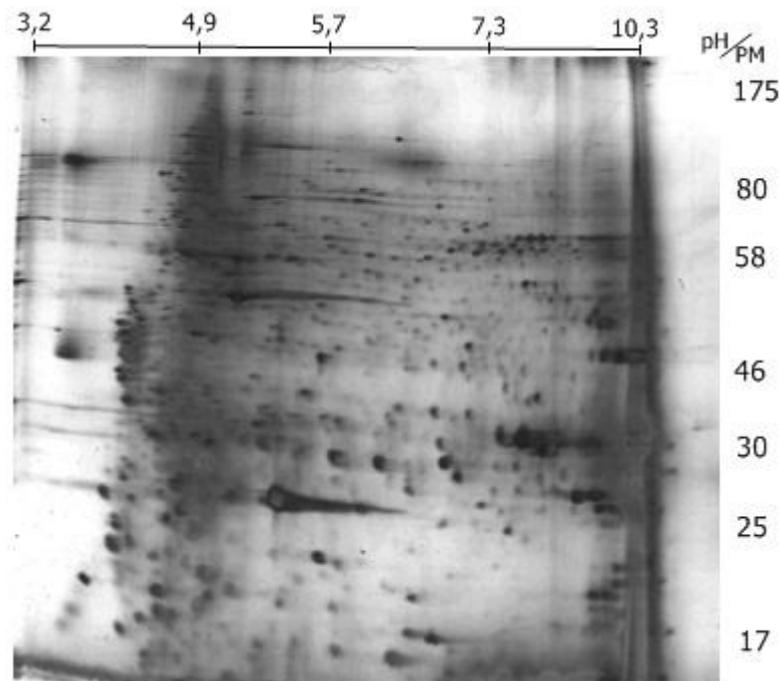


Figura 16: Perfil eletroforético em 2D-PAGE 10%, fita 13 cm pH 3-10 Não-Linear de proteínas de membranas de hemácias não infectadas (HNI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range* (7-175 kDa) (P7709S). Gel corado com nitrato de prata.

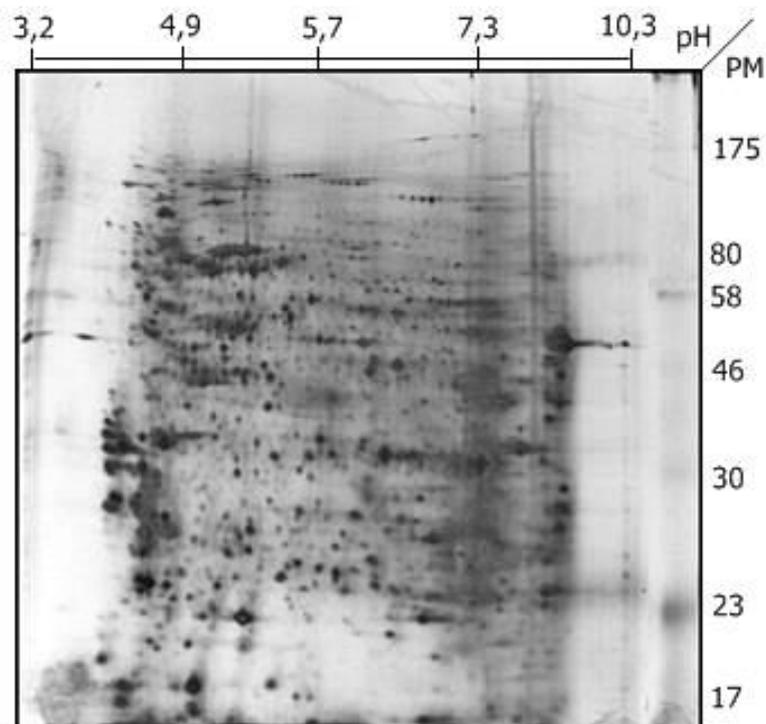


Figura 17: Perfil eletroforético em 2D-PAGE 10%, fita 13 cm pH 3-10 Não-Linear de proteínas de membranas de hemácias infectadas com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – *ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range* (7-175 kDa) (P7709S). Gel corado com nitrato de prata.

Observando as figuras acima, percebe-se que os resultados obtidos aqui, são bem satisfatórios, tendo em vista que, comparada aos géis unidimensionais, a

técnica bidimensional demonstra uma capacidade muito maior de separação, revelando um número de proteínas imperceptíveis no gel em uma dimensão. Além disso, os géis obtidos com a metodologia empregada neste, apresentam uma boa resolução comparada a outros trabalhos, o que demonstra um grande avanço na capacidade de detecção de spots.

Tal fato pode ser comprovado analisando-se, de forma qualitativa, a Figura 18, onde comparou-se os resultados obtidos neste trabalho para o perfil de separação de proteínas de membrana de hemácia não infectada (HNI) com os resultados obtidos por Rabilloud e colaboradores (1999) e Fontaine e colaboradores (2011) para o mesmo tipo de amostra, é possível perceber que houve uma melhor detecção de *spots*, ou seja, visualização de um maior número de proteínas. Além disso, o poder de resolução apresentado pelo método empregado neste, mostrou-se bastante satisfatório.

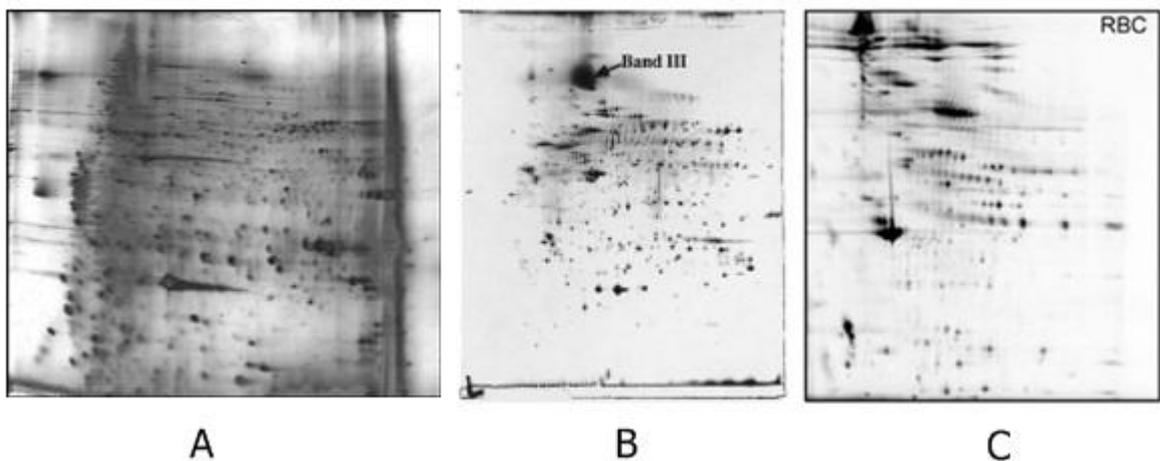


Figura 18: Comparação qualitativa dos resultados de separação de proteínas de membranas de hemácias não infectadas obtidos em três diferentes trabalhos (A) Resultados obtidos neste. (B) Resultados obtidos por Rabilloud e colaboradores (1999). (C) Resultados obtidos por Fontaine e colaboradores (2011).

A mesma análise feita acima, pode se estender para os diferentes resultados de separação de proteínas de membrana de hemácias infectada por *P. falciparum*

(Figura 19). Nesta comparação pode-se observar que os resultados obtidos neste trabalho, demonstraram a detecção de um maior número de proteínas na faixa de pH 3-10, comparado a outros trabalhos. Além de Rabilloud e colaboradores (1999) e Fontaine e colaboradores (2011), pode-se citar ainda a título de comparação, Panpumthong & Vattanaviboon (2006); Wu & Craig (2006); Fontaine e colaboradores (2010) e Torrentino-Madamet e colaboradores (2011). Com isso, acredita-se que após processo de identificação, seja possível encontrar proteínas que ainda não foram identificadas e assim poder contribuir para os avanços nessa área.

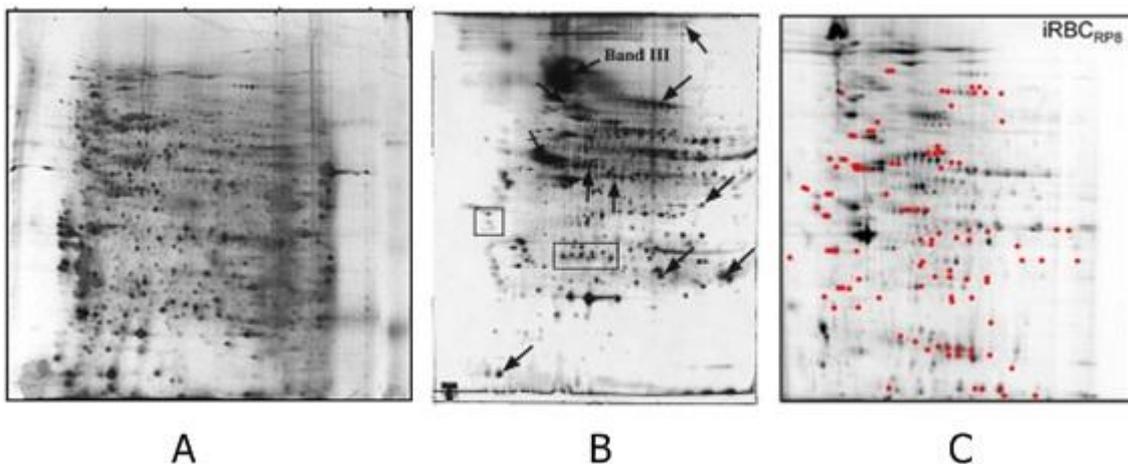


Figura 19: Comparação qualitativa dos resultados de separação de proteínas de membranas de hemácias infectadas por *P. falciparum* obtidos em três diferentes trabalhos (A) Resultados obtidos neste. (B) Resultados obtidos por Rabilloud e colaboradores (1999). (C) Resultados obtidos por Fontaine e colaboradores (2011).

Além disso, um bom resultado de *western blot* só é alcançado se houver uma boa separação das proteínas em uma etapa anterior. Por isso, decidiu-se utilizar aqui, a técnica de eletroforese 2D como método de separação das proteínas anterior ao método de detecção de proteínas imunorreativas, *western blot*.

Com o objetivo de identificar proteínas de membranas de hemácias infectadas por *P. falciparum* imunorreativas para soro de pacientes assintomáticos para malária, realizou-se *western blot*, onde utilizou-se o soro de paciente assintomático

(PIPSN-03), tendo em vista que este soro apresentou o maior número de proteínas imunorreativas nos testes feitos com a separação por eletroforese unidimensional.

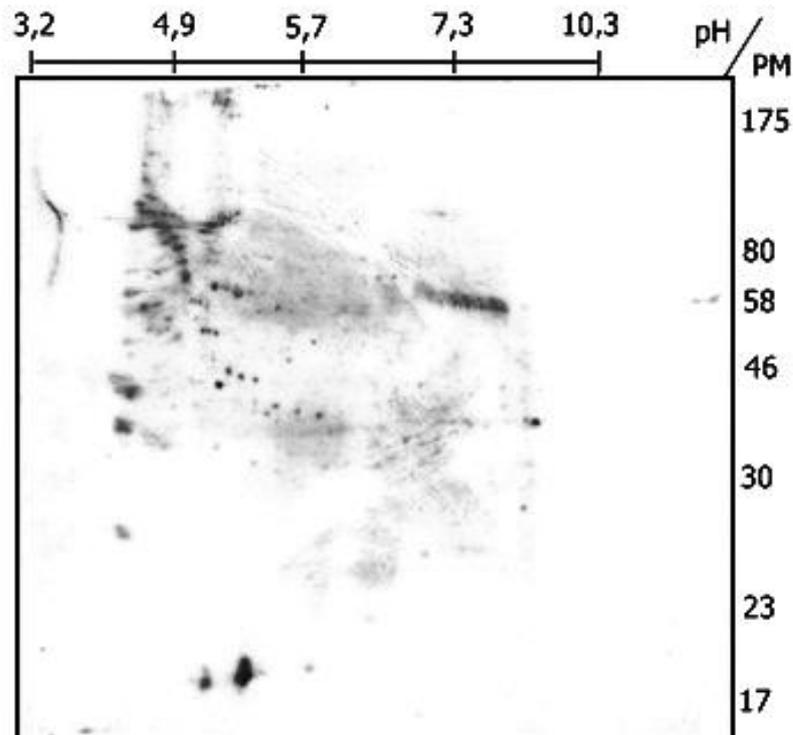


Figura 20: Western blot realizado com soro de paciente infectado e assintomático (PIPSN-03), diluição 1:1000. Perfil eletroforético em 2D-PAGE 10%, fita 13 cm pH 3-10 Não-Linear de proteínas da membrana de eritrócito infectado com *P. falciparum* (HI). Peso molecular (PM) – ColorPlus Prestained Protein Marker – Broad Range (7-175 kDa) (P7709S). Proteínas transferidas para uma membrana de PVDF, poro tamanho 0,45 μm . Proteínas imunorreativas reveladas com DAB.

Os resultados apresentados na Figura 20 mostraram, mais uma vez, um grande número de proteínas reconhecidas. Além disso, é possível observar que a maioria dessas proteínas encontra-se em uma faixa de massa entre 46 e 150 kDa. Outro detalhe é que estas também se encontram concentradas em uma faixa de pH entre 4,0 e 5,5. Apesar de grande parte dessas proteínas encontrarem-se próximas umas das outras, acredita-se que esta técnica poderá ajudar bastante no processo de identificação das mesmas e assim, contribuir com a tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual determinados indivíduos, oriundos da Amazônia, são protegidos contra os sintomas da malária.

Analisando as imagens da Figura 21 é possível ter uma noção das vantagens que a técnica oferece, tendo em vista que, serão a partir de comparações de imagens como estas, que haverá a seleção de proteínas para o processo de identificação em um trabalho posterior.

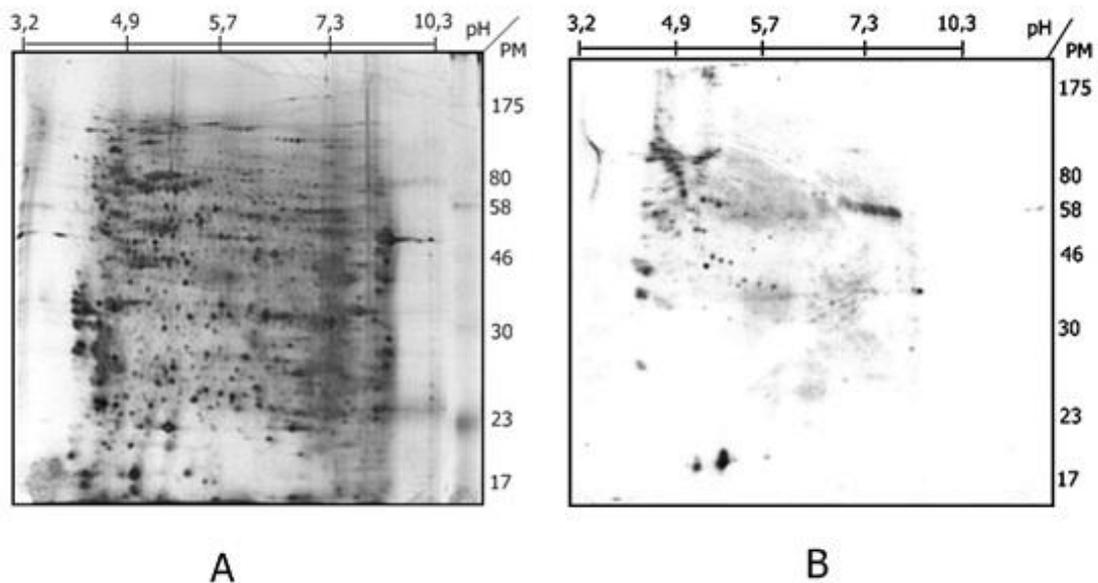


Figura 21: Comparação qualitativa dos resultados de separação de: (A) Perfil eletroforético em 2D-PAGE (igual figura 17). (B) *Western blot* (igual Figura 20).

Em virtude de este trabalho ser pioneiro na utilização da técnica de *western blot*, a partir de eletroforese 2D, com soro de paciente assintomático provenientes da região amazônica, uma comparação melhor da eficiência da técnica fica relativamente prejudicada. Entretanto, o alto número de proteínas imunorreativas e bem resolvidas, mostradas nas figuras acima, indica que a metodologia empregada é eficiente e proporcionou resultados satisfatórios.

5 – CONCLUSÃO

- Os métodos empregados forneceram resultados satisfatórios, tendo em vista que foi possível separar e observar a presença ou ausência de proteínas imunorreativas;
- Houve diferença de resposta imunoquímica entre pacientes sintomáticos e assintomáticos;
- A separação por eletroforese 2D demonstrou uma maior resolução na separação das proteínas, demonstrando que este é um bom método para este tipo de análise;
- O *western blot* proveniente da eletroforese 2D ampliou a resolução das proteínas imunorreativas e demonstrou que este é um bom método a ser utilizado quando pretende-se identificar proteínas posteriormente.

6 – REFERÊNCIAS

ADAMS, J. H., et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. **89**, n.15, p. 7085-7089, 1992.

ALBRECHT, L., et al. Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon Plasmodium falciparum isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. **150**, p. 157-16, 2006.

ALBRECHT, L., et al., The South American Plasmodium falciparum var gene repertoire is limited, highly shared and possibly lacks several antigenic types. *Gene*, v. **453**, p. 37-44, 2010.

ALVES, F. P., et al. High prevalence of asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. **66**, n. 6, p. 641-8, 2002.

BAIRD, J. K., et al. Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. **45**, p. 65-76, 1991.

BAIRD, J. K. Host Age as a Determinant of Naturally Acquired to Plasmodium falciparum. *Parasitology Today*, v. **11**, n. 3, p. 105-111, 1995.

BAIRD, J. K. Age-dependent Characteristics of Protection v. Susceptibility to Plasmodium falciparum. *Trop. Med. Parasitol.*, v. **92**, n. 4, p. 367-90, 1998.

BARATA, R. C. B. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Cad. de Saúde Pública*, v. **1**, n. 11, p.128-36, 1995.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. **8**, p. 93-99, 1987.

BRADFORD, M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, v. **72**, p. 248-254, 1976.

BRUCE-CHWATT, L. J. IN: **Essential Malariology.**, William Heisemann Medical Books, 2^a ed., London; 1985.

BUENO, L. L. **Resposta imune celular e humoral de pacientes infectados por Plasmodium vivax frente ao antígeno 1 de membrana apical (AMA-1)**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

BURNETTE, W. N. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. **112**, n. 2, p. 195-203, 1981.

BUTCHER, H., et al. A sensitive timeresolved fluorescent immunoassay for metallothionein protein. **Elsevier**, v. **272**, n. 1, p. 247-256, 2003.

CAMARGO, L. M., et al. Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. **51**, n. 1, p. 16-25, 1994.

CAMUS, D.; HADLEY, T. J. A Plasmodium falciparum anti-gen that binds to host erythrocytes and merozoites. **Science**, v. **230**, p. 553-556, 1985.

CHIZZOLINI, C., et al. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted Plasmodium falciparum-specific antibodies in Gabonese newborns. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. **45**, p. 57-64, 1991.

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v. **192**, p. 733-737, 1961.

COHEN, S.; BUTCHER, G. A. Serum antibody in acquired malarial immunity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. **65**, p. 125-135, 1971.

COOKE, B. M., et al. The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes. **Adv. Parasitol**, v. **50**, p. 1-86, 2001.

COOKE, B. M. Protein trafficking in Plasmodium falciparum-infected red blood cells. **Trends Parasitol**, v. **20**, p. 581-589, 2004.

COPPEL, R. L., et al. MESA is a Plasmodium falciparum phosphoprotein associated with the erythrocyte membrane skeleton. **Mol Biochem Parasitol**, v. **3**, p. 223-31, 1988.

DA SILVA-NUNES, M. & FERREIRA, M. U. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the " symptomatic " vs " asymptomatic " dichotomy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. **102**, n. 3, p. 341-7, 2007.

DAMERVAL, C., et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheatseedling proteins. **Electrophoresis**, v. **7**, p. 52-54, 1986.

DODOO D., et al. Antibodies to variant antigens on the surfaces of infected erythrocytes are associated with protection from malaria in Ghanaian children. **Infect. Immun.**, v. **69**, p. 3713-3718, 2001.

DOOLAN, D. L., et al. Identification of Plasmodium falciparum antigens by antigenic analysis of genomic and proteomic data. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **100**, p. 9952-9957, 2003.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired Immunity to Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. **22**, n. 1, p. 13-36, 2009.

DRUILHE, P.; KHUSMITH, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of Plasmodium falciparum and malaria immune status. **Infect. Immun.**, v. **55**, p. 888-891, 1987.

DURASINGH, M. T., et al. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in Plasmodium falciparum utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **100**, p. 4796-4801, 2003.

EDOZIEN, J. C.; GILLES, H. M.; UDEOZO, I. O. K. Adult and Cord Blood Gammaglobulin and Immunity to Malaria in Nigerians. **Lancet**, v. **2**, p. 951-955, 1962.

EGAN, A. F., et al. Clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. **J. Infect. Dis.**, v. **173**, p. 765-769, 1996.

FLORENS, L., et al. Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. **135**, n. 1, p. 1-11, 2004.

FONTAINE, A., et al. Specific antibody responses against membrane proteins of erythrocytes infected by Plasmodium falciparum of individuals briefly exposed to malaria. **Malaria Journal**, v. **9**, p. 276, 2010.

FONTAINE, A., et al. Plasmodium falciparum infection-induced changes in erythrocyte membrane proteins. **Parasitol Res.**, 2011.

FRATUS, A. S. B. **Expressão e Reconhecimento Imune de Alelos Conservados de Antígenos Variantes de Plasmodium falciparum**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

FUJIOKA, H. AIKAWA M. Structure and Life Cycle. **Chem. Immunol.**, v. **80**, p. 1-26, 2002.

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos. Proteomic analysis of bovine yolk sac**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

GAO, Y., et al. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. **485**, p. 131-137, 2003.

GARRAUD, O., et al. Peripheral blood mononuclear cells in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*: characterization and functional aspects of T lymphocytes. **Res. Immunol.**, v. **140**, p. 857-874, 1989.

GARRAUD, O., et al. Manipulating blood T cells and B cells from squirrelp. onkeys: some technical considerations. **J. Immunol. Methods**, v. **173**, p. 165-173, 1994.

GE Healthcare. **2-D Electrophoresis**. Principles and methods, p. 67, 2004.

GOMEZ-ARIZA, J. L. et al. Analytical characterization of bioactive metal species in the cellular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. **85**, p. 255-266, 2005.

GONÇALVES, R. M. **Análise fenotípica de células T reguladoras e células dendríticas na infecção humana por *P. vivax* e *P. falciparum***. Dissertação (mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2010.

GOOD, M. F., et al. Development and regulation of cell mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annu. Rev. Immunol.**, v.**23**, p.69-99, 2005.

GÖRG A., et al. Improved resolution of PI (alpha 1- antitrypsin) phenotypes by a large-scale immobilized pH gradient. **Am. J. Hum. Genet.**, v. **37**, n. 5, p. 922-30, 1985.

GÖRG A., et al. The current state of two-Dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. **21**, p. 1037-1053, 2000.

GRIFFING, S. M., et al. South American *Plasmodium falciparum* after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids. **PLoS ONE**, v.**6**, n. 9, 2011.

GUERRA, C. A., SNOW, R. W., HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends. Parasitol.**, v. **22**, p. 353-358, 2006.

GUPTA, S.; DAY, K. P. A theoretical framework for the immunoepidemiology of *Plasmodium falciparum* malaria. **Parasite Immunol.**, v. **16**. n. 7, p. 361-70, 1994.

GUPTA, S. et al. Immunity to non- cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. **Nat. Med.**, v. **5**, n. 3, p. 340-3, 1999.

HALDAR, K.; MOHANDAS, N. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. **Current Opinion Hematol**, v. **14**, p. 203-209, 2007.

HERBERT, B. R. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, p. 660-663, 1999.

HERBERT, B. R.; et al. What place for polyacrylamide in proteomics? **Trends in Biotechnology (Oxford)**, v. 19, p. 3-9, 2001.

HOGH, B., et al. Relationship between maternally derived anti-Plasmodium falciparum antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, west Africa, in which malaria is highly endemic. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4034-4038, 1995.

HVIID, L.; STAALSOE, T. Malaria immunity in infants: a special case of a general phenomenon? **Trends Parasitol**, v. 20, n. 2, p. 66-72, 2004.

HVIID, L. Naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum malaria in Africa. **Acta Trop.**, v. 95 n. 3, p. 270-5, 2005.

KATSURAGAWA, T. H., et al. Endemias e epidemias na Amazônia—malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do rio Madeira. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 111-41, 2008.

KATSURAGAWA, T. H. **Efeito do tratamento de portadores de infecção assintomática por plasmódio na incidência de malária em população ribeirinha de Porto Velho – Rondônia**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Rondônia, 2010.

KINYANJUI S. M., et al. Protection against clinical malaria by heterologous immunoglobulin G antibodies against malaria-infected erythrocyte variant surface antigens requires interaction with asymptomatic infections. **J. Infect. Dis.**, v. 190, p. 1527-1533, 2004.

KNELL, A. J. **Malaria**. Oxford university press, 1991.

KONINGWARD T. F, et al. A new rodent model to access blood stage immunity to the Plasmodium falciparum antigen merozoite surface protein 119 reveals a protective role for invasion inhibitory antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 869-875, 2003.

KORBEL, D. S.; FINNEY, O. C.; RILEY, E. M. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 1517-28, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectrometry**. Kluwer Academic, 1999.

LIMA, A. O., et al. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnica e Interpretação**. p: 2-32, 2001.

LUNEL, F.; DRUILHE, P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. **Infect. Immun.**, v. **57**, p. 2043-2049, 1989.

LUZ, F. C.; FERNANDEZ-RAMIREZ, C. T. Diagnóstico Laboratorial de Malária, Curso número 2, módulo A2, B2, C2, D1, D2, E1, E2, **3º Reunião Nacional dos Pesquisadores em Malária**, UnB, Brasília, 1990.

MAGISTRADO, et al. Immunoglobulin G Antibody Reactivity to a Group A *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 and Protection from *P. falciparum* Malaria. **Infection and Immunity**, v. **75**, n. 5, p. 2415-2420, 2007.

MAIER, A. G., et al. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. **Nat. Rev. Microbiol**, v. **7**, n. 5, p. 341-54, 2009.

MCGREGOR, I. A. Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of antibody responses in malaria in man. **Bull World Health Organ**, v. **50**, p. 259-266, 1974.

MCGREGOR, I. A. The Passive Transfer of human Malarial Immunity. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. **13**, p. 237-239, 1964.

MOLL, K., et al. **Methods in Malaria Research**. 5^a ed, 2008. [http://www.biomalpar.org/updatedMethods_In_Malaria_Research_5thedition.pdf].

MILLER, L. H., et al. The Pathogenic Basis of Malaria Insight Review articles. **Nature**, v. **415**, n. 7, p. 673-679, 2002.

MOTA, M. M., et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, v. **291**, p. 141-144, 2001.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. **9**, p. 255-262, 1988.

NEVES, D. P. et al. **Introdução a Parasitologia**. In **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu, Cap. 15, 2005.

O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. **250**, 1975.

OFORI M. F. et al. Malaria-induced acquisition of antibodies to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. **Infect. Immun.**, v. **70**, p. 2982-2988, 2002.

OGUTU, B. R. et al. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western. **PLoS ONE**, v. **4**, n. 3, p. 4708. 2009.

OLESEN, C. H., et al. Distinct patterns of blood-stage parasite antigens detected by plasma IgG subclasses from individuals with different level of exposure to *Plasmodium falciparum* infections. **Malaria Journal**, v. 9, n. 296, 2010.

OPAS – Organización Panamericana de la Salud. Malária, redução de casos. Em 2008, Brasil avança na redução do número de casos de malária no País. [Internet]. 2009 [acesso em 5 Nov 2009]. Disponível em: http://new.paho.org/bra/index.php?option=com_content&task=view&id=401&Itemid=259

PALMER, C. J., et al. Increased prevalence of *Plasmodium falciparum* malaria in Honduras, Central America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 4, p. 40-42, 1998.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PANPUMTHONG, P.; VATTANAVIBOON, P. Improvement of Proteomic Profile of *Plasmodium falciparum* by Two-step Protein Extraction in Two-dimensional Gel Electrophoresis. **Thammasat Int. J. Sc.Tech.**, v. 11, n. 3, 2006.

PASVOL, G.; WEATHERALL, D. J.; WILSON R. J. M. Effects of Foetal Haemoglobin on Susceptibility of Red Cells to *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 270, p. 171-173, 1977.

PEI, X., et al. The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. **Blood**, v. 110, n. 3, 2007.

POLLEY, S. D., et al. Repeat sequences in block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 4, p. 1833-42, 2003.

POLOGE, L. G., et al. Primary structure and subcellular localization of the knob-associated histidine-rich protein of *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 7139-7143, 1987.

POMBO, D. J., et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **Lancet**, v. 360, p. 610-617, 2002.

RABILLOUD, T., et al. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-316, 1997.

RABILLOUD, T., et al. Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte ghosts. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3603-10, 1999.

RENART J.; REISER J.; STARK G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying

antibody specificity and antigen structure. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, n. 7, p. 3116-120, 1979.

REY, LUÍS. **Parasitologia**. 4^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

REYBURN, H., et al. Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe Plasmodium falciparum malaria. **Jama**, v. 293, n. 12, p. 1461-70. 2005.

ROCHA, T. L. et al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Comunicado Técnico 136), p. 12, 2005.

ROGERSON, S. J., et al. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 7, n. 2, p. 105-17, 2007.

SABCHAREON, A., et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 45, p. 297-308, 1991.

SAN SEBASTIAN, M.; JATIVA, R.; GOICOLEA, I. Epidemiology of malaria in the Amazon basin of Ecuador. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 7, p. 24-28, 2000.

SARGEANT, T. J. et al. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. **Genome Biol.**, 2006.

SHARMA, V. P. Current scenario of malaria in India. **Parassitologia**, v. 41, p. 349-353, 1999.

SIDDIQUI, W. A. L. Q.; et al. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against Plasmodium falciparum malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, n. 9, p. 3014-8, 1987.

SIM, B. K., et al. Primary structure of the 175K Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. **Cell Biol.**, v. 111, p. 1877-1884, 1990.

SIM, B. K., et al. Induction of biologically active antibodies in mice, rabbits, and monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA vaccine. **Mol. Med.**, v. 7, p. 247-254, 2001.

SIVEP-Malária. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Notificação de Casos. Disponível em: http://www.saude.gov.br/sivep_malaria.

SOUZA, G. G. B., et al. Fragmentação de moléculas pela luz Síncrotron e por elétrons rápidos. **Química Nova**, 2001.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 169-80, 2004.

STURM, A., et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. **313**, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.

SIVEP_MALARIA – Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Malária. Disponível em http://www.saude.gov.br/sivep_malaria. Acesso em 17/07/2010

SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. **378**, n. 54, 2004.

TORRENTINO-MADAMET, M., et al. Proteomic analysis revealed alterations of the Plasmodium falciparum metabolism following salicylhydroxamic acid exposure. **Research and Reports in Tropical Medicine**, 2011.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **76**, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. **193**, n. 4254, p. 673-5, 1976.

TRIGLIA, T., et al. **The complete sequence of the gene for the knob-associated histidine-rich protein from Plasmodium falciparum.** EMB., p. 1413-1419, 1987.

VAN, O. C., et al. The malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. **PLoS Pathogens**, v. **4**, :e1000084. [PubMed: 18551176], 2008.

WEATHERAL, D. J. L., et al. **Malaria and the Red Cell.** Hematology, p.35-57, 2002.

WEBSTER, D.; HILL, A. V. Progress with new malaria vaccines. **Bull World Health Organ**, v.**81**, p. 902-909, 2003.

WHO – **World Health Organization. World Malaria Report 2008**

WHO – **World Health Organization. World Malaria Report 2011.**

WIPASA, J. S., et al. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunol Cell Biol.**, v. **80**, n. 5, p. 401-14, 2002.

WU, Y.; CRAIG, A. Comparative proteomic analysis of metabolically labelled proteins from Plasmodium falciparum isolates with different adhesion properties. **Malaria Journal**, v. **5**, n. 67, 2006.

YONE, C. L., et al. Persistent Epstein-Barr viral reactivation in young African children with a history of severe Plasmodium falciparum malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. **100**, p. 669-676, 2006.