

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

MUTAÇÕES SINÔNIMAS E NÃO SINÔNIMAS COMO UM
DOS MECANISMOS DE GERAÇÃO DE POLIMORFISMO DO
ANTÍGENO MSP1 de *Plasmodium vivax*.

JANAINA DE ARAÚJO EVANGELISTA

MANAUS –AM

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JANAÍNA DE ARAÚJO EVANGELISTA

**MUTAÇÕES SINÔNIMAS E NÃO SINÔNIMAS COMO UM
DOS MECANISMOS DE GERACAO DE POLIMORFISMO DO
ANTÍGENO MSP1 de *Plasmodium vivax*.**

Dissertação apresentada ao
Programa Multi-institucional de
Pós-Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal do
Amazonas para a obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia

Orientação: Dr. Paulo Afonso Nogueira

MANAUS- AM
2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Evangelista, Janaína de Araújo

E92m Mutações sinônimas e não sinônimas como um dos mecanismos de geração de polimorfismo do antígeno MSP1 de *P.vivax* / Janaína de Araújo Evangelista. - Manaus: UFAM, 2012.

61 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Dr. Paulo Afonso Nogueira

1. Malária 2. *Plasmodium vivax* 3. Gene MSP1 4. Diversidade genética I. Nogueira, Paulo Afonso (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 616.936(043.3)

JANAÍNA DE ARAÚJO EVANGELISTA

**Título: MUTAÇÕES SINÔNIMAS E NÃO SINÔNIMAS COMO UM DOS
MECANISMOS DE GERACAO DE POLIMORFISMO DO ANTÍGENO
MSP1 de *P.vivax*.**

Dissertação apresentada ao
Programa Multi-institucional de
Pós-Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal do
Amazonas para a obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia

Aprovado em 06 de maio de 2011

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira
FIOCRUZ- MANAUS**

**Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi
FIOCRUZ- MANAUS**

**Prof. Dr. Luís André Morais Mariúba
FIOCRUZ- MANAUS**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido, junto com o meu esforço a alcançar os meus objetivos.

Ao meu orientador Dr. Paulo Afonso Nogueira. Agradeço-o hoje pela paciência, compreensão, cobranças que eu sei que foram com o intuito de me alertar para algo e pela contribuição e incentivo à pesquisa.

Aos colegas: mestranda Edilene, doutoranda Leidiane, mestranda Luciana, técnico Davi que me apoiaram em alguns procedimentos no laboratório, como por exemplo extração de DNA, PCR , preparo de tampões.

Ao Dr Luis André Mariúba por ter me acompanhado em muitos experimentos me ensinando alguns procedimentos laboratoriais que aprendi ao longo do mestrado.

A Dra. Patrícia Orlandi pela sua contribuição ao longo da pesquisa e pelas sugestões na banca da qualificação e da defesa do mestrado.

Ao Prof. Dr. José Odair pelas sugestões, paciência e tranquilidade para resolver os problemas.

Ao Prof. Dr. Edmar Andrade, na figura de coordenador do PPGBIOTEC, pela paciência, pelas sugestões, e também pelos puxões de orelha quando necessário.

A minha amiga Mirna Sayuri, pelo incentivo, pelo exemplo de perseverança, trabalho e por estar sempre aqui na UFAM prestes a ajudar no que eu precisava.

As secretárias Elzimar, Nubiane por me prestarem informações e agilizar a entrega dos documetos quando necessário.

À FIOCRUZ por dispor da infra estrutura para realizar essa pesquisa, além das pessoas que lá encontrei dispostas a ajudar e colaborar com essa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de nível Pessoal (CAPES) por financiar essa pesquisa.

Em especial, à minha família por ser paciente nos momentos em que estive ausente e por acreditarem em mim, sempre me incentivando e me estimulando para que eu concluísse essa pesquisa.

RESUMO

A malária é um problema da saúde pública amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo. No continente americano, o *Plasmodium vivax* é responsável por maior parte das infecções. No ano de 2011, 250.498 casos de malária foram observados no estado do Amazonas; 80% destes casos foram causados por *Plasmodium vivax*.

O objetivo desse trabalho foi Investigar a geração de diversidade do gene MSP1 de *Plasmodium vivax* através da análise de mutações pontuais na região do bloco 2, eventos de precombinação genética.

Para identificar as mutações existentes nas infecções multiclonais e geração de diversidade em *PvMSP1* realizou-se uma série de experimentos, respectivamente, a extração de DNA genômico do parasita, PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) utilizando primers específicos para o bloco 2, ligação do fragmento ao vetor de clonagem (TOPO), transformação utilizando células de *E.coli* competentes , seleção de colônias pertencentes a uma mesma amostra, seqüenciamento de DNA e análise das mutações não sinônimas e sinônimas quanto sua localização em regiões de predição de epítomos de células B e T (não sinônimas).

O cálculo da distância genética entre clones recombinantes de uma mesma amostra pelo programa MEGA 4.0 confirmou a multiclonalidade das amostras. O alinhamento das sequências de aminoácidos mostrou a presença de eventos de recombinação genética utilizando o programa DNASP. As sequências de DNA obtidas demonstrou outro resultado interessante: várias mutações sinônimas e não sinônimas num trecho relativamente pequeno de DNA. A diversidade genética mostrou mais mutações não sinônimas, sendo que maior parte delas estavam localizadas em regiões previstas como epítomos das células B e T pelo programa BcPred e ProPred.

Assim, como esperado, a diversidade genética baseado nas mutações sinônimas e não sinônimas sustenta o fenômeno de escape sobre a imunidade do hospedeiro. A caracterização desses polimorfismos poderá contribuir para estudos imunológicos visando o desenvolvimento de uma vacina contra os estágios eritrocitários da malária causada por *P.vivax*.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*, mutações sinônimas, mutações não sinônimas, diversidade genética, gene MSP1.

ABSTRACT

The “malária” fever is a public health problem, widely distributed in tropical and subtropical regions of the planet. In North America, *Plasmodium vivax* is responsible for the most part of the infections. In 2011, 250,498 cases of “malaria” fever were studied; 80% of these cases were caused by *Plasmodium vivax*.

The purpose of this study was to investigate the diversity generation of the gene MSP1 from *Plasmodium vivax* through the analysis of a specific mutation in the region from the block 2 genetic recombination events.

In order to identify the existing mutations in multiclonal infections and generation of diversity in PvMSP1 a series of experiments were done, respectively, the extraction of genomic DNA of the parasite, PCR (polymerase chain reaction) using specific primers for the block 2, ligation of the fragment to cloning vector (top), processing using *Escherichia coli* competent cells, selection of colonies belonging to the same sample, DNA sequencing and analysis of synonymous and non-synonymous mutations as their location in the prediction of B and T cell epitopes (not synonymous).

The calculation of genetic distance between recombinant clones of the same sample by the MEGA 4.0 program confirmed the multiclonality of samples. The alignment of amino acid sequences showed the presence of genetic recombination events using DNASP program. DNA sequences obtained showed another interesting result: several synonymous and non-synonymous mutations in a relatively small stretch of DNA. Genetic diversity showed most mutations are not synonymous, and that most of them were located in regions referred to as B and T cell epitopes by BcPred and ProPred.

So, as expected, the genetic diversity based on synonymous mutations and not synonymous possible sustains the phenomenon of escape on the immunity of the host. The characterization of these polymorphisms may contribute to immunological studies aiming at the development of a vaccine against malaria on stages caused by *p. vivax*.

Keywords: *Plasmodium vivax*, synonymous mutations, non-synonymous mutations, genetic diversity, MSP1 gene.

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1. Representação esquemática das áreas de risco para malária vivax, definidas por dados do PvAPI.	16
2. Figura 2. Mapa mostrando a incidência parasitária anual no Brasil.	17
3. Figura 3. Representação esquemática de antígenos variantes em <i>P. falciparum</i> (PfEMP).	20
4. Figura 4. Representação esquemática do processamento da MSP1 (Proteína de Superfície do Merozoíto).	23
5. Figura 5. Representação esquemática do gene MSP1 de <i>Plasmodium vivax</i> com retângulos representando blocos conservados entre as espécies.	23
6. Figura 6. Representação esquemática do gene <i>PvMSP1</i> .	24
7. Figura 7. Representação de uma alíquota de sangue após centrifugação com a formação de três camadas.	30
8. Figura 8. Resultado da extração de DNA com Kit comercial Charge Switch gDNA Kit(Invitrogen)	36
9. Figura 9. Resultado da PCR para o bloco 2 com fragmentos de cerca de 500pb.	37
10. Figura 10. Resultado da extração plasmidial (mini prep) referente às amostras 10 e 15.	37
11. Figura 11. Resultado da purificação de DNA plasmidial utilizando Kit comercial Mini Prep (Kiagen)	38
12. Figura 12. Figura esquemática mostrando um eletroferograma de amostra seqüenciada e o padrão de qualidade da mesma	38
13. Figura 13 Resultado da pesquisa de similaridade no programa Blast (genbank)	39
14. Figura 14. Sequências homólogas entre diferentes isolados com possíveis pontos de recombinação	40
15. Figura 15. Diversidade nucleotídica por mutações sinônimas e não sinônimas gerando polimorfismos na região do bloco 2.	41

16. Figura 16. Localização das mutações não-sinônimas relacionadas a predição linear de epítomos B e T	44
17. Figura 17. Resultado do alinhamento de diferentes haplótipos referentes a amostra 10 e 15	45
18. Figura 18. Mutações não-sinônimas e predição de epítomos dos haplótipos. em isolados da amostra 10	47
19. Figura 19 - Mutações não-sinônimas e predição de epítomos dos haplótipos em isolados da amostra 15	48

LISTA DE TABELAS

1. Tabela 1. Distância genética entre nove colônias de clones recombinantes <i>PvMSP1</i> provenientes da amostra 10.	42
2. Tabela 2. Distância genética entre treze colônias de clones recombinantes <i>PvMSP1</i> da amostra 15 .	43

LISTA DE SIGLAS

PvAPI	–	<i>Plasmodium vivax</i> anual parasite incidence
ICB	–	Interespecie Conserved Blocks
IPA	–	Índice Parasitário anual
VSA	–	Variants superfície antigens
PfEMP1	–	<i>Plasmodium falciparum</i> Membrane Protein 1
<i>PvMSP1</i>	–	gene <i>Plasmodium vivax</i> Merozoite Surface Protein 1
LGS	–	Linkage Group Selection
NCBI	–	National Center of Biotechnology information
PCR	–	Polymerase Chain reaction
BLAST	–	Basic Local Alignment Search Tool
<i>Vir</i> genes	--	genes de virulência em <i>Plasmodium vivax</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.0. Malária no Mundo	15
1.2. Malária no Brasil	16
1.3. Mecanismos de escape do parasita	18
1.4. Infecções multiclonais em <i>Plasmodium SP</i>	20
1.5. Proteínas polimórficas são alvo para vacina contra malária	21
1.6. O antígeno MSP1	22
1.7. Polimorfismos e geração de novos alelos em MSP1	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. METODOLOGIA	29
3.1. Amostragem	30
3.2. Extração de DNA genômico	31
3.3. PCR do bloco 2 do gene <i>PvMSP1</i>	31
3.4. Ligação ao vetor de clonagem	31
3.5. Preparação de célula competente	32
3.6. Transformação	32
3.7. Seleção	32
3.8. Extração de DNA plasmidial	33
3.10. Sequenciamento do fragmento	33
3.11. Busca por similaridade	33
3.12. Análise de haplótipos e infecções multiclonais	34
3.13. Predição de epítomos de células B e T	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Extração de DNA genômico	36
4.2. Resultados da PCR para o gene <i>PvMSP1</i>	36
4.3. Extração de DNA plasmidial	37
4.4. Purificação do plasmídio	38
4.5. Sequenciamento do fragmento	38

4.6. Alinhamento e busca por similaridade com sequências do bloco 2 disponíveis no banco de dados do NCBI	39
4.8. Mutações, deleções e eventos de recombinação gênica	40
4.9. Cálculo da distância genética e confirmação das infecções multiclonais	42
4.10. Mutações sinônimas e não sinônimas e predição de epítomos em haplótipos das amostras	43
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. Anexo 1	61

1. INTRODUÇÃO

1.0. Malária no Mundo

A malária encontra-se amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo. O *Plasmodium vivax* é mais amplamente distribuído no globo que o *Plasmodium falciparum*. No entanto, o *P.falciparum* é o responsável por maior números de casos de morbidade e mortalidade. Atualmente, 106 países vivem em área endêmica de malária. Destes, 103 (9 da África e 29 da Ásia (WHO, 20011). Alguns fatores como o desenvolvimento de resistência a drogas, dificuldades de controlar o mosquito vetor e o baixo crescimento econômico tem tornado alguns países tropicais incapazes de controlar a doença (GOOD *et al*, 2005). O grau de endemicidade da doença tem sido tradicionalmente subdividido em cinco grupos: hipoendêmica, menor que 10%, mesoendêmica de 10 a 49%, hiperendêmica de 50-74% e holoendêmica maior ou igual a 75%, sendo que o grau de endemicidade de malária nas diversas regiões do globo está associado a prevalência do parasita (SULLIVAN, 2010).

Em 2008 foram estimados 243 milhões de casos de malária e 86300 mortes no mundo. O *Plasmodium falciparum* é responsável por 91% dos casos de malária no mundo, a maior parte restrita ao continente Africano. Em contrapartida, o *Plasmodium vivax* dentre as espécies causadoras da malária humana, é a de maior distribuição geográfica, dessa forma, expondo um maior número de pessoas ao risco de infecção (GUERRA *et al*, 2006), o que tem dificultado o controle da malária vivax (STTABONGCOT J *et al*, 2004; BAIRD JK, 2009). Estima-se que cerca de 2,85 bilhões de pessoas no mundo todo estão expostas ao risco de infecção por *P. vivax* (Figura 1), sendo que a grande maioria (91%) estão localizadas na parte central e sudeste da Ásia, 5,5% localizadas na América e 3,3% na África (GUERRA *et al*, 2010). O mapa da figura 1, usado para diferenciar as áreas de risco (áreas livres de malária das áreas malarígenas), classifica as áreas malarígenas em instáveis em rosa ($PvAPI < 0,1$ por 1.000 pessoas p.a.) e estáveis em vermelho($PvAPI \geq 0,1$ por 1.000 pessoas p.a) (HAY S.A. *et al*, 2010).

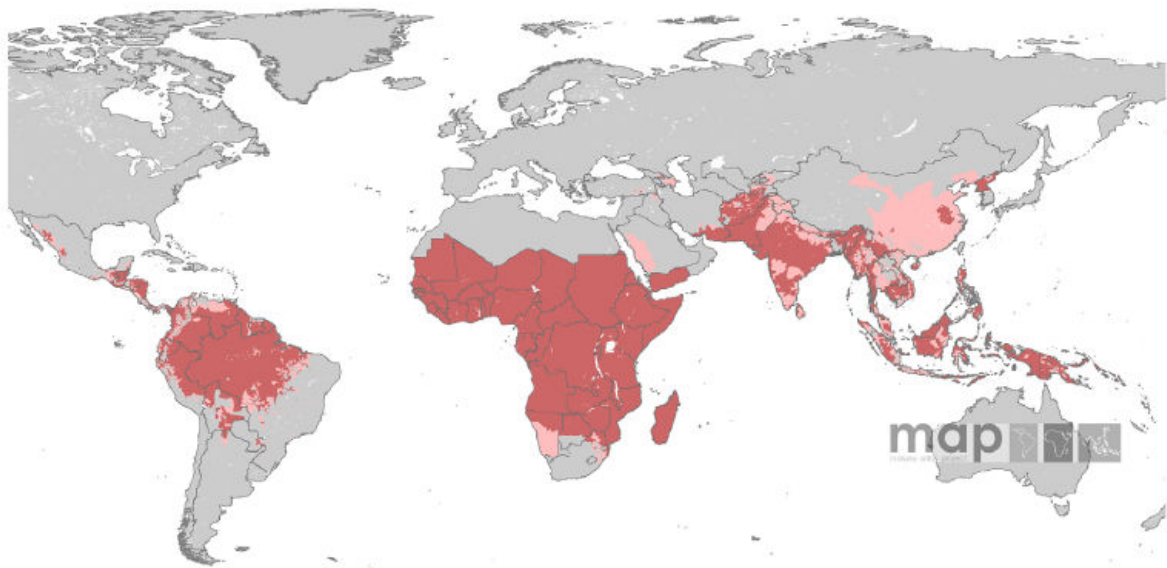


Figura 1 – Representação esquemática das áreas de risco para malária vivax, definidas por dados do PvAPI.

Fonte: GUERRA *et al*, 2010

Embora o *P. falciparum* seja o mais patogênico nas infecções maláricas, o *P. vivax* vem assumindo importante causa de morbidade em regiões com alto grau de transmissão desse agente etiológico, como podemos observar na figura 1 (PRICE *et al*, 2007; GUERRA *et al*, 2010). Em países do Sudeste da Ásia está presente em mais de 50% dos casos, nas Américas exceto no Haiti e na República Dominicana está presente em 77% dos casos de malária (WHO,2009).

1.1. Malária no Brasil

Cerca de 99,5% dos casos de malária no Brasil ocorrem na região da bacia Amazônica, incluindo os estados do Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e região ocidental do Maranhão (SARAIVA M.G.G. *et al*, 2009).

A ocupação desordenada da Amazônia se deu na década de 70, o que contribuiu para o aumento da transmissão da malária. Nos últimos anos, Manaus apresenta grandes áreas de conglomerados urbanos em regiões periféricas, resultante do fluxo migratório de outros municípios em busca de oportunidades de trabalho (SARAIVA, M. G. G. *et al*, 2009), dessa forma o risco de contrair a doença não é uniforme, sendo medido por índice parasitário anual (IPA), que serve para classificar as áreas de transmissão em alto risco- IPA maior que 49,9 casos de

malária por mil habitantes; médio risco -IPA entre 10 e 49,9 casos de malária por mil habitantes, baixo risco -IPA de 0,1 a 9,9 casos/1000 habitantes e zero risco. Na figura 2 é possível observar a incidência parasitária anual nos anos de 1999 e 2005. Nesse período, observou-se uma redução em mais de 50% dos casos de malária que foi de 635.646 casos para 46.233 casos. Nesse mesmo período observou-se uma importante alteração na dinâmica de transmissão da malária com concentração de casos em alguns municípios. O número de municípios de alto risco passou de 160 para 67 municípios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

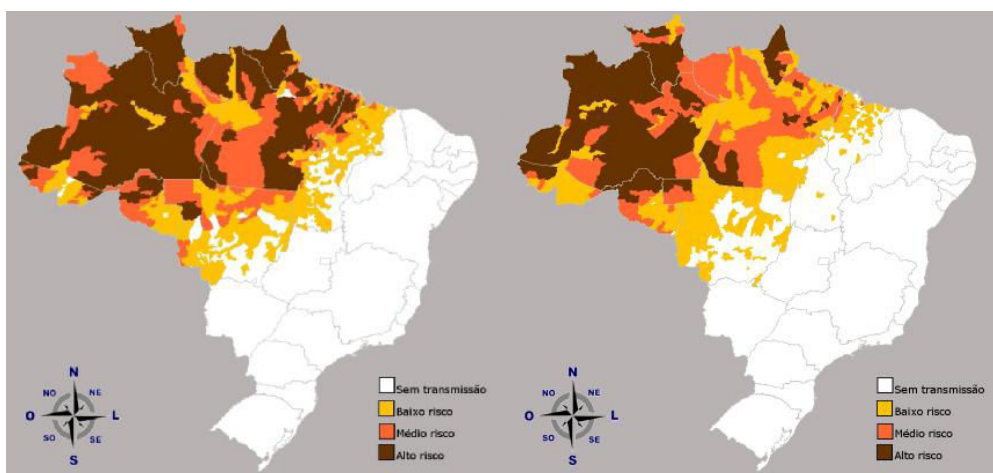


Figura 2 – Mapa mostrando a incidência parasitária anual no Brasil.

Fonte: SISMAL/SIVEP/SVS/MS ATUALIZADO EM 28/12/2009

As áreas de alto risco têm como principais características floresta tropical úmida, que favorece a transmissão principalmente em grupos de trabalhadores expostos às altas densidades de *Anopheles darlingi*, dentro e fora de moradias precárias que não oferecem proteção e população de migrantes com baixa imunidade. Áreas de médio risco, encontra-se floresta menos densa, devido à ocupação humana mais antiga, contendo uma população humana com maior imunidade. Geralmente, corresponde a migrações das áreas rurais para áreas urbanas localizadas principalmente, na margem dos grandes rios. Áreas de baixo risco são aquelas de malária instável onde a transmissão foi interrompida na década de 70, porém conservam o potencial malarígeno, áreas de transmissão eventual, com predomínio de vetores secundários e com infra-estrutura social bem desenvolvida. As áreas sem risco são aquelas com ausência de fatores

epidemiológicos necessários para a transmissão da malária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Um levantamento epidemiológico da malária em Manaus no período de 1986 a 2005 mostrou que o incremento populacional progressivo da cidade de Manaus nesse período foi responsável pelos desmatamentos, assentamentos humanos de forma programada ou desordenada (invasões) de áreas antes cobertas por mata, providas de mananciais, estabelecimento de práticas laborais, como piscicultura tem sido fatores determinantes para a reintrodução e a permanência da malária, principalmente em áreas urbanas da cidade (SARAIVA, M.G.G., *et al* 2009).

Cepas resistentes de *Plasmodium* tem se desenvolvido e se distribuído, principalmente em áreas endêmicas de malária, áreas onde se faz o uso impróprio das drogas anti-maláricas ou utilizam estratégias inadequadas de combate e controle. Dados recentes mostram que há recidiva em 20 a 80% dos casos de malária vivax de acordo com o grau de incidência em determinada localidade (PRICE *et al*, 2007). Estudos recentes tem evidenciado o aumento de casos graves de malária na região da bacia Amazônica em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* (ALEXANDRE, M. A. A. *et al*, 2004).

1.2. Mecanismos de escape do parasita

Ainda nos dias de hoje a resposta imune ao parasita da malária é complexa e pouco entendida. Torna-se evidente que o mesmo venha mantendo-se ao longo dos séculos por seleção natural positiva (PUTAPONTIRP *et al*, 2006) e que o hospedeiro utiliza tanto a resposta imune celular quanto a produção de anticorpos para controlar o crescimento do parasita em vários modelos de sistemas. No entanto para que o hospedeiro adquira uma imunidade sem patologia, o mesmo tem que dispor de um repertório de anticorpos efetivo contra múltiplas linhagens. Caso contrário embora saibamos que em humanos e modelos animais a resposta mediada por célula pode controlar o crescimento do parasita, ela desencadeia uma resposta inflamatória antiparasitária com liberação de citocinas inflamatórias que estão implicadas na patogênese da malária cerebral, anemia, baixo peso, e prejuízo na respiração.

Tendo em vista que a diversidade antigênica é um fenômeno comum a todas as espécies de *Plasmodium* e que ela pode ser considerada um mecanismo evolucionário importante do parasita da malária. Segundo Ferreira e colaboradores (2004) esse fenômeno tem origem em dois fatores: um deles é o clássico mecanismo de recombinação gênica que gera polimorfismos alélicos, dificultando a aquisição de uma imunidade clínica (DAY, K. P.; MARSH, K. 1991, FERREIRA *et al*, 2004), uma das razões pelas quais a imunidade clínica só se desenvolve depois de repetidas infecções com a mesma espécie de *Plasmodium*.

O segundo mecanismo é a variação antigênica, que é a habilidade do parasita em variar as proteínas de superfície durante o curso da infecção para evadir do sistema imune, variando o fenótipo do parasita. Dessa forma uma única linhagem clonal de parasitas expressa sucessivamente formas alternativas do mesmo antígeno, sem variar o genótipo, (OLIVEIRA *et al*, 2006; CARLTON *et al*, 2008). Dentre os antígenos de superfície variantes (VSAs) expressos pelo parasita da malária, podemos citar: *vir* genes, que é uma superfamília de genes localizadas na região subtelomérica dos cromossomos presentes em *Plasmodium vivax*. Acredita-se que exista cerca de 350 genes *vir* por genoma haplóide. As proteínas VIR estão exclusivamente localizadas nas superfícies dos eritrócitos infectados e estão implicados na evasão da resposta imune (DEL PORTILLO H. A. *et al*, 2001). PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* membrane Protein 1) é composto por cerca de aproximadamente 60 cópias de genes variantes em cada parasita, sendo que cada um expressa uma das cópias ao mesmo tempo (figura 3). Essa variação antigênica do PfEMP1 expressa em cada clone, torna o eritrócito infectado capaz de se ligar a muitos receptores e tecidos no hospedeiro através de seus múltiplos domínios (figura 3), incluindo CD36, ICAM I, sulfato de condroitina A e ácido hialurônico, ligando-se nas vênulas e a diferentes tecidos do hospedeiro resultando em seqüestração de formas no estado maduro do parasita que expressam PfEMP1, dificultando a sua eliminação pelo baço, conseqüentemente fugindo da resposta imune específica. A aglutinação a eritrócitos não infectados (rosetas), e aglutinação de eritrócitos infectados através de plaquetas estão também associados patogenicidade da malária (MILLER, L.H. *et al*, 2002).

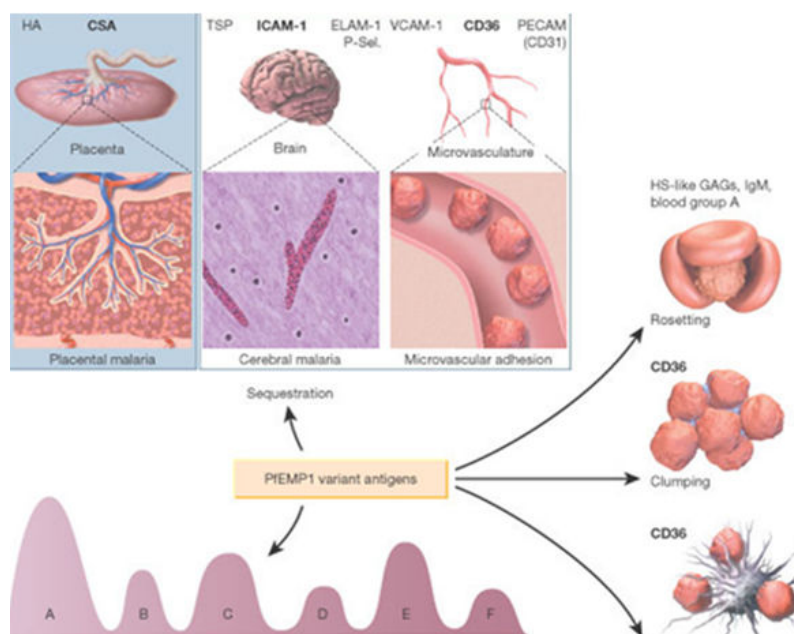


Figura 3- Representação esquemática de antígenos variantes em *P.falciparum* (PfEMP1).

1.3. Infecções multiclonais em *Plasmodium sp*

As infecções maláricas que consistem de genótipos mistos para uma mesma espécie podem ser extremamente comuns em seres humanos constituindo mais de 80% das infecções em áreas de alta transmissão (BELL A. S. *et al*, 2006). Estudos mostram que uma maior variação na antigenicidade e no repertório genético em populações de *P. falciparum* em áreas de alta transmissão é gerada por uma maior frequência de eventos de recombinação que ocorrem no mosquito (BABIKER H.A, *et al*, 1994). Múltiplas linhagens de *Plasmodium* no indivíduo têm sido reportadas em diferentes regiões do globo, informações da natureza e extensa diversidade genética das espécies de *Plasmodium* podem estar associadas à patologia da malária, a aquisição de imunidade, ao surgimento de resistência a drogas e as condições de transmissão (MAKISSON & READ 2004). Com relação à patologia, tendo em vista que em infecções maláricas clones geneticamente distintos competem entre si dentro do hospedeiro (BELL A. S. *et al*, 2006), observou-se que em roedores que a relação entre presença de infecções multiclonais e o aumento dos índices de transmissão de um genótipo individual do *Plasmodium chaubaudi* de malária sendo demonstrado em experimentos com linhagens clonais que a competição favorece as cepas de maior virulência (TAYLOR *et al*, 1997; DE ROODE *et al*, 2005). Aumento da transmissibilidade em infecções multiclonais está associado em alguns estudos ao

aumento da produção de gametócitos, levando ao aumento da transmissibilidade do mosquito (TAYLOR *et al*, 1997; DE ROOD *et al*, 2005). Já com relação à resistência medicamentosa, notou-se que ao remover os clones sensíveis em uma mistura contendo clones resistentes e sensíveis à droga, a população de clones resistentes crescia numa proporção maior do que se a competição nunca estivesse presente .

Finalmente, infecções multiclonais podem provocar recidivas comprovadas por métodos moleculares de detecção do *Plasmodium vivax* em pacientes continuamente expostos em área de alta transmissão de malária (WARGO *et al*, 2007).

1.4. Proteínas polimórficas são alvos para vacina contra malária

Os alvos específicos de imunidade protetora à malária ainda são desconhecidos, mas existem evidências de cerca de 20 antígenos candidatos. A maioria deles são proteínas de superfície polimórficas, visto que estruturalmente, diferentes antígenos são expressos durante cada parte do ciclo de vida do parasita, levando a uma imunidade adquirida estágio-específica (BERZINS *et al*, 1999). Tendo em vista que a imunidade na malária é também cepa-específica (CONWAY *et al*, 2000), proteínas polimórficas expressas pelo parasita tem sido alvo de estudo para o desenvolvimento de uma vacina para malária. Embora a dificuldade de se desenvolver uma vacina universal contra malária, pesquisadores demonstram em estudos de diversidade genética a existência de diferentes haplótipos correspondentes a essas proteínas presentes no parasita variando de acordo com a região em estudo, levando em conta fatores como: grau de transmissão da doença, alta ou baixa endemicidade, presença de infecções multiclonais. Tendo em vista que em regiões endêmicas, a imunidade protetora é induzida por infecções naturais contra com parasitas contendo geralmente mais de uma cepa, levando alguns anos para que o indivíduo adquirir uma imunidade clínica (WIJAYALATH *et al*, 2008). Diante disso, uma solução para minimizar o problema da indução vacinal por uma única cepa seria o desenvolvimento de uma vacina com a combinação de mais de um alelo do mesmo antígeno (BARCLEY, V. C. *et al*, 2008). No entanto, acredita-se que a inclusão de mais de uma forma alélica de um antígeno não seria suficiente para superar a existência dos polimorfismos que decorrem em grande parte do

fenômeno de recombinação gênica que ocorre no vetor (SAUL A., 2007). Em contrapartida, estudos apontam que embora a imunidade em induções vacinais utilizando um único alelo seja eficaz, composições bi-alélicas apresentam menor impacto na seleção clonal pelo hospedeiro, por apresentarem menores alterações nas composições clonais do mesmo (BARCLEY C. V. *et al*, 2008).

Muitas proteínas tem sido estudadas como alvos para vacinas contra malária e a técnica de PCR atualmente é utilizada para examinar alelos dos genes da proteína de superfície do merozoíto MSP1 e MSP2 (VIRIYAKOSOL,S. *et al*,1996), Apical merozoite antigen 1, AMA-1 (BARCLEY C. V. *et al*, 2008), proteína circunsporozoíta (ZAKERI,S. *et al*, 2006), proteína rica em Glutamato (GLURP)(VIRIYAKOSOL,S *et al*,1996).

1.5. O antígeno MSP1

Dentre outros antígenos da forma assexuada sanguínea do parasita, a MSP-1 tem recebido mais atenção por ser considerada a primeira molécula líder candidata à vacina contra o estágio assexuado sanguíneo do parasita, tendo sido comprovado o papel do gene *PvMSP-1*(*Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1) na resposta adquirida à malária (NOGUEIRA *et al*, 2005) e em induções vacinais (YANG *et al*, 1999; HERRERA *et al*, 2007). Considerada a maior proteína de superfície do estágio eritrocítico do *Plasmodium* e sabe-se que desempenha um papel na invasão do eritrócito (HOLDER *et al*, 1992). O gene *PvMSP1* expressa uma proteína de 190 a 200kDa (DEL PORTILLO, 1998). Estudos indicam que essa proteína é processada em duas etapas de clivagem proteolítica durante a maturação do merozoíto, como mostra a figura 4. Primeiramente, é clivada em quatro fragmentos de cerca de 83kDa, 30kDa,38kDa e 42kDa. Uma segunda etapa cliva o fragmento C-terminal de 42kDa em um polipeptídio de 33kDa que é posto na circulação e uma porção de 19kDa (MSP1-19) que permanece aderido ao merozoíto após a sua invasão (FREEMAN R.R.; ROLDER, A.A., 1983).

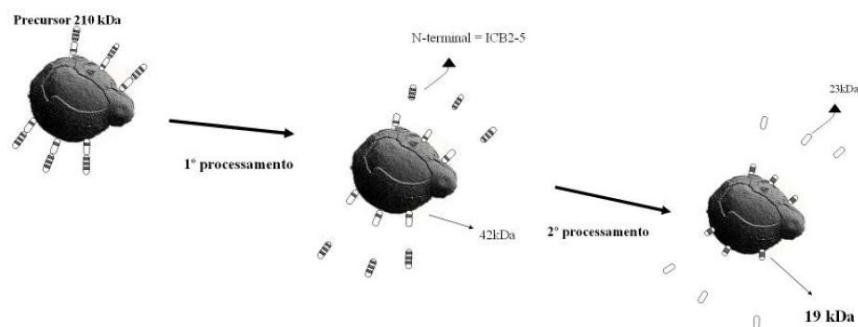


Figura 4 – Representação esquemática do processamento da MSP1 (Proteína de Superfície do Merozoíto).

A comparação das seqüência de proteínas de parasitas da malária humana *P. vivax* e *P. falciparum* e da malária em roedores *P. yoelli* revelou a presença de 10 blocos conservados entre as espécies (ICBs) e oito regiões polimórficas entre eles, como podemos observar na figura 5 (DELL PORTILLO H.A., 1991).

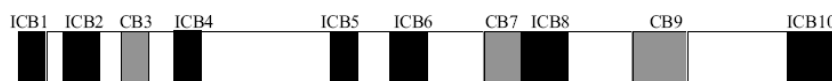


Figura 5- Representação esquemática do gene *msp-1* de *Plasmodium vivax* com retângulos representando blocos conservados entre as espécies (ICBs) e blocos conservados (CBs).

Os genes *PvMSP1* e *PfMSP1* são basicamente similares. A organização desses genes é subdividida em blocos baseados no nível de diversidade genética. São composto por uma porção de blocos interalélicos variáveis intercalados com blocos conservados (PUTAPONTIRP *et al*, 2002). A estrutura primária do *PvMSP1*, originalmente caracterizada em duas linhagens de *P.vivax* (Belém e Salvador-1) que foram adaptadas ao macaco, exibe regiões conservadas, semi-conservadas e polimórficas (DEL PORTILLO *et al*, 1991; GIBSON *et al*, 1992).

O gene *PvMSP1* é composto por seis domínios polimórficos (quatro deles repetitivos), separados por regiões conservadas como mostra a figura 6. Os blocos variáveis mostram variação nas seqüências repetitivas e nas não repetitivas e numerosos locais de recombinação são distribuídos ao longo do gene *PvMSP1*, tanto na seqüências dos blocos conservados como dos variáveis sem uma distribuição uniforme (PUTAPORNTIP, 2002).

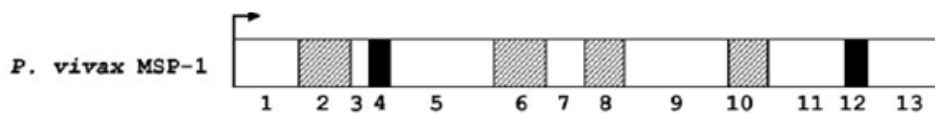


Figura 6 – Representação esquemática do gene *PvmSP-1*. As regiões conservadas estão em branco, as regiões listradas e pretas são polimórficas, sendo repetitivas e dimorfismo, respectivamente.

Análises de regiões específicas de genes derivados de parasitas isolados do Sri Lanka (PREMANZA *et al*, 1993), Colômbia (MANCILA *et al*, 1994) e Tailândia (PUTAPONTIRP *et al*, 1995), sugerem recombinação interalélica entre as sequências tipificadas Belém e Salvador-1, suportando a noção de que os polimorfismos em *mSP-1* de *P. vivax* não é dimórfico na natureza. Estudos iniciais de imunização com MSP1 purificada de estágios sanguíneos mostrou que macacos e roedores poderiam ser vacinados com sucesso contra *P. Yoelli* ou *P. falciparum* respectivamente (HOLDER, A. A., RILEY, E. M. 1996). O potencial dessa molécula para vacina motivou estudos baseados na geração de proteínas recombinantes contendo porções da MSP1.

Estudos de imunidade adquirida contra MSP1 de *P. vivax* foram iniciados após o achado de que humanos vivendo em áreas endêmicas também desenvolviam anticorpos contra diferentes regiões da proteína (DEL PORTILLO *et al*, 1991).

Análises sorológicas contra proteínas recombinantes correspondentes às regiões polimórficas e conservadas demonstraram que a região N-terminal apesar de ser imunogênica, está associada com episódios de malária recente. Diferentemente a região N-terminal do gene *PvMSP1* está associada à proteção clínica e risco reduzido de infecção, cujos anticorpos contra essa região são adquiridos naturalmente (NOGUEIRA *et al*, 2006).

1.6. Polimorfismos e geração de novos alelos em *mSP-1*.

Tanto em *P. falciparum* quanto em *P. vivax* observa-se dimorfismo alélico no gene que codifica a Proteína de superfície do merozoíto (MSP1), uma potencial candidata à vacina contra malária. No entanto, a alta quantidade de polimorfismos existente nos antígenos de superfície do parasita, especialmente em *P. vivax* (CUI *et al*, 2003), além de ser um obstáculo ao desenvolvimento de uma vacina para

malária, reflete em efeitos combinados na história da população de parasitas e na seleção obrigatória imposta pelo sistema imune do parasita (ESCALANTE *et al*, 2004). Os polimorfismos existentes no gene que codifica a MSP1 são gerados por diferentes mecanismos (TANABE *et al*, 1987): pontos de mutação resultando em polimorfismos em nucleotídeos (SNPs), os quais parecem permanecer estáveis ao longo do tempo (TANABE *et al*, 2004) e acredita-se que tenha origem remota (POLLEY *et al*, 2005); inserção ou deleção de repetições causa polimorfismos nas repetições, que são muito comum (FERREIRA *et al*, 2003) e cuja extensão e o tamanho das repetições são usados para genotipar o parasita (SNOUNOW *et al*, 1999); e recombinação meiótica envolvendo a troca de fragmentos de genes entre alelos produzindo novos alelos na progênie. Dentre todos esses mecanismos a recombinação genética é o maior na geração de diversidade nos alelos no gene que codifica a MSP1 (TANABE *et al*, 2007). Possíveis locais de recombinação têm sido mapeados para regiões específicas em *msp1* (TANABE *et al*, 1987).

Análise de vários alelos do gene que codifica a MSP1 tem mostrado que as variações no gene não são dimórficas. Tem sido proposto e subsequentemente confirmado que os polimorfismos estruturais na MSP1 são resultado de recombinação intragênica entre diferentes alelos no estágio sexuado que ocorre no mosquito vetor (TANABE *et al*, 1987).

Embora muitos estudos tenham sido feitos, utilizando moléculas de proteínas existentes no parasita com o objetivo de imunização contra o *P. vivax*, a imunidade adquirida ao *P. vivax* em infecções naturais tem sido verificadas em estudos realizados em regiões endêmica de malária. Utilizando proteínas recombinantes para partes específicas da MSP1, verificou-se que em pacientes assintomáticos os níveis de anticorpos estavam altos para a região N-terminal da MSP1, associando esta resposta com proteção a infecção. No entanto diferentes níveis de anticorpos foram observados para reconhecimento dessa porção da MSP1 nas amostras. Isso deve estar associado a aquisição de anticorpos contra o repertório de antígenos polimórficos apresentados em indivíduos continuamente expostos e a aquisição de imunidade verificada após repetidas infecções com a mesma espécie de parasita (NOGUEIRA *et al*, 2006; BASTOS *et al*, 2007). Além disso estudos demonstram

que a MSP1 tem papel na invasão do merozoíto e é acessível a anticorpos e sistema complemento (HOLDER *et al*, 2009).

O gene *PvMSP1* é constituído por sete blocos conservados intercalados com seis blocos polimórficos (quatro deles repetitivos). Os blocos variáveis mostram variações nas sequências, como números de substituições, inserções, deleções e números de repetições, pontos de recombinação, sendo comum encontrarem substituições dimórficas nos blocos conservados(PUTAPONTIRP *et al*, 2002, 2006).

A diversidade genética do bloco 2 do gene MSP1 de *P.vivax* é gerada e mantida na região Amazônica ao longo do tempo. Dessa forma, análise dos possíveis pontos de recombinação, substituições, deleções, inserções, polimorfismos e predição de epítomos de células B e T serão examinados neste estudo.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Investigar a geração de diversidade do gene MSP1 através da análise de mutações pontuais na região do bloco 2.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar as seqüências obtidas e comparar as similaridades com seqüências encontradas no banco de dados do NCBI ;
- Determinar a distancia genética das seqüências em cada caso isolado;
- Estimar o numero de haplótipos como indicativo de policlonalidade da infecção pelo *P. vivax*.

3. METODOLOGIA

3.1. Amostragem

Foram utilizadas sete amostras previamente identificadas como malária causada por *P.vivax*, pelo método da gota expressa. Os pacientes selecionados foram aqueles que apresentaram entre duas e três cruzes de malária causada por *P. vivax* diagnosticadas na Fundação de Medicina Tropical do Estado do Amazonas. Cada amostra selecionada resultou em dez colônias de DNA recombinante a fim de que o objetivo do estudo pudesse ser alcançado. A pesquisa desenvolvida foi aprovada em comitê de Ética em Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº 3640.0.000115-07(Anexo 1).

As amostras foram coletadas após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Essa coleta de sangue foi por via intravenosa em tubos contendo EDTA. Após a retirada de sangue infectado, o mesmo foi centrifugado a 8000 rpm/10min, formando três fases no centrifugado. Do qual foi retido a primeira e segunda fase, a qual é composta de plasma e creme leucocitário (figura 7). O creme leucocitário é constituído de leucócitos e plaquetas. A terceira fase é composta de sedimentos com hemácias, a qual foi aliqüotada em volumes de 500µL. Essas amostras foram armazenadas em -80° C para as subseqüentes análises.

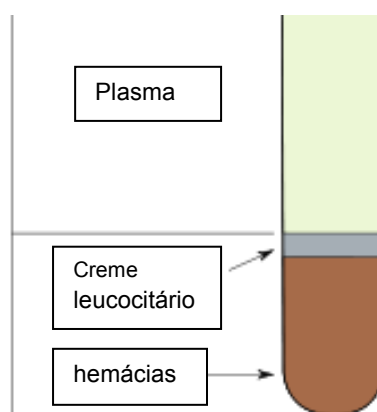


Figura 7 – Representação de uma aliqüota de sangue após a centrifugação, com a formação de três camadas. O plasma em cima, os leucócitos no meio e as hemácias no fundo do tubo.

3.2. Extração de DNA genômico

A partir do sedimento de hemácias infectadas com *Plasmodium vivax*, obtidas após centrifugação do sangue total contendo EDTA, o DNA genômico do parasita foi extraído por “kit” comercial (*Charge switch* gDNA 50-100µL Blood kit (Invitrogen)). O método utilizado pelo fabricante do “kit” consiste em separar o DNA da amostra por pequenas esferas magnéticas que em baixas condições de pH se tornam positivas, se ligando ao DNA que tem carga negativa. Após a extração o DNA de dentro das hemácias, o mesmo foi visualizado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo, visualizado em luz ultravioleta.

3.3. PCR do bloco 2 do gene *PvMSP1*

Após a extração de DNA genômico, foi realizada a amplificação de fragmentos de cerca de 500pb pela técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), com a utilização de iniciadores que reconhecem o bloco 2, 6 e 10 do gene *PvMSP1*. Para o bloco 2: PvF1 (5' CTCTGACAAAGAGCTGGAC 3'), PvR9 (5' TACTACTTGATGGTCCTCAAAAG 3'), na concentração de 10pM. As concentrações padronizadas para os reagentes utilizados na reação são: 2,5µM de Tampão 10x, 2,5µM de DNTP, 3µM de primer forward, 3µM de primer reverso, 1µM de MgCl₂, 2,5µM de DNA e 0,5µM Taq DNA polimerase. A PCR foi realizada nas seguintes condições: 95°C 5 minutos 1x, 94° 1 minuto, 63°C 1 minuto, 72°C 1minuto 36x, 72°C 1minuto 1x. Após a PCR o produto foi misturado a um tampão de corrida (load buffer) e posteriormente aplicado em gel de agarose 1% e visualizado em transluminador após ter sido corado com brometo de etídio.

3.4. Ligação ao vetor de clonagem

Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor de clonagem TOPO (INVITROGEN) em uma reação que seguiu o método proposto pelo fabricante do vetor e utilizou os reagentes contidos em seu kit. O sistema de ligação do DNA ao vetor de clonagem constituiu-se de: 4µL do produto de PCR, 1µL de solução Salt,

0,5µL de água, 0,5µL de vetor. A ligação ocorreu numa temperatura de 16°C, overnight.

3.5. Preparação de célula competente

A preparação da célula competente seguiu o proposto por INOQUE *et al*, (1990). Foram utilizados 5µL da ligação para transformação por choque térmico, 100µL de células de E-coli, linhagem TOP 10. Os fragmentos de DNA clonados em vetor TOPO (Invitrogen) e posteriormente foram inseridos em célula *E.coli*, linhagem TOP 10 F'.

3.6. Transformação

Os 105 µL obtidas no tópico 3.5 foram colocados a 42°C por noventa segundos, em seguida colocou-se no gelo por dois minutos. Adicionou-se ao sistema 400µL de solução S.O.C ou LB+ e deixamos estufa à 37°C sob agitação por quarenta e cinco minutos . Posteriormente, foi realizado a semeadura, utilizando um volume de 10µL do produto de cada transformação em placas contendo o meio de cultura LB- Ágar com antibiótico. Para avaliar a eletro competência da célula foi utilizado um controle positivo que consistia de um plasmídeo conhecido e para excluir qualquer hipótese de contaminação foi utilizado um controle negativo.

3.7. Seleção

De acordo com o protocolo do kit TOPO de clonagem, as colônias obtidas possuem o inserto em estudo, devido a existência de um gene letal que é expresso pelo vetor quando ele não recebe o inserto, induzindo a apoptose da célula. As colônias crescidas serão submetidas a uma extração plasmidial utilizando o kit de extração plasmidial mini-prep (Qiagen), sendo seu protocolo fornecido pelo fabricante. Os plasmídios obtidos foram em seguida seqüenciados.

3.8. Extração de DNA Plasmidial

Após clonagem e transformação do inserto referente ao bloco 2 do *PvMSP1* em célula de *E. coli*, foi realizada a extração plasmidial de dez colônias crescidas pertencentes a cada amostra. A extração do plasmídio das colônias contendo DNA recombinante foi realizada com kit comercial (mini prep Qiagen), conforme instruções do fabricante.

No entanto antes que o plasmídio fosse extraído, as colônias foram postas para crescer em 3mL de meio LB com tetraciclina e ampicilina por 16 a 18 horas, sob agitação a 37°C.

3.9. Seqüenciamento do fragmento

O seqüenciamento do fragmento com o vetor TOPO foi realizada na plataforma de seqüenciamento FIOCRUZ (Bahia). Após o seqüenciamento as seqüências obtidas foram analisadas pelas ferramentas PHRED e CAP3 para a correção dos possíveis erros de leitura do seqüenciamento, disponível no site: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/phph.pl>. Dessa forma, disponibilizando a quantidade de leituras do seqüenciamento com base em cálculo dos gráficos dos eletroferogramas.

3.10. Busca por similaridade

Em seguida, para a investigação de mais de um haplótipo na mesma amostra fez-se um alinhamento entre as seqüência obtidas utilizando os programas EditSeq e MegAlign do pacote Lasergene versão 4.05 (DNA Star). No entanto, para as demais análises como busca de potenciais pontos de mutações e comparações com as seqüências de *PvMSP1* depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology information*), utilizou-se as ferramentas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), sendo o BLASTn utilizado para a comparação das seqüências nucleotídicas e BLASTx, para comparação das seqüências protéicas (ambas disponíveis no site: www.ncbi.nlm.nih.gov). Essas ferramentas foram

também utilizadas para fazer um banco de dados local. As amostras seqüenciadas contendo a região do loco 2 do gene *PvMSP1*, juntamente com as seqüências nucleotídicas encontradas no banco de dados mundial (NCBI), passaram por uma segunda etapa: alinhamento múltiplo de seqüências, utilizando a ferramenta clustaw w, que disponibiliza as seqüências para um alinhamento linear exato, possibilitando a visualização dos possíveis pontos de mutações e visualizar as similaridades encontradas com as seqüências comparadas.

3.11. Análise de haplótipos e infecções multiclonais

A distância genética entre as seqüências provenientes da mesma amostra foi estimada através do modelo de distância de Tamura e Nei (1993), disponível no programa Mega 4.0 (TAMURA et al, 2007).

3.12. Predição de epítomos de células B e T

A predição de epítomos de célula B foi realizada utilizando o programa BepiPred 1.0 Server (LARSEN, JEP; NILSEN, O.L., 2006). Epítomos putativos de célula B foram gerados com especificidade de 75%. Os epítomos das células T abrangendo fragmentos do bloco 2 foram preditos usando o programa ProPred MHC class II binding peptide prediction Server (SINGH, H.; RAGHAVA, G.P., 2001), para quatro alelos de MHC classe II: HLA DRB1*0101, DRB1* 0401, DRB1 0701 e DRB1*1101.

4. RESULTADOS

4.1. Extração de DNA genômico

O DNA foi extraído dos eritrócitos de dois pacientes infectados com *Plasmodium vivax* utilizando kit comercial *Charge switch* gDNA Blood kit (Invitrogen). Na figura abaixo podemos visualizar o padrão de bandas resultante da extração de DNA de amostras de pacientes com malária causada por *Plasmodium vivax* provenientes da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM).

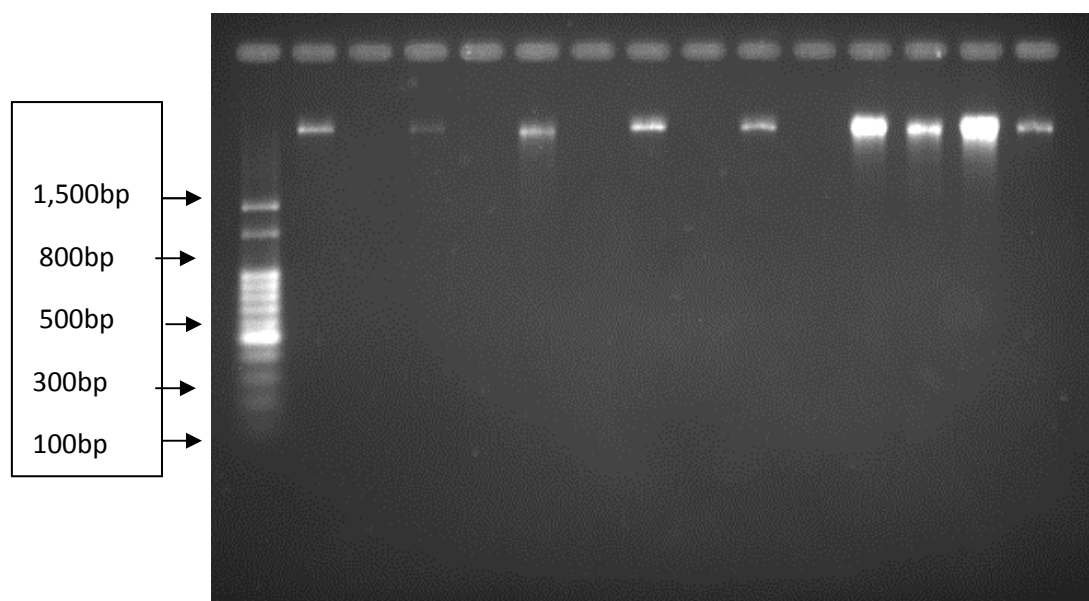


Figura 8- Resultado da extração de DNA com kit comercial *Charge switch* gDNA Blood kit (Invitrogen). O Ladder comercial Promega de 100PB foi utilizado como Padrão de Peso Molecular visualizado na primeira canaleta do gel de agarose 0,8% .

4.2. Resultado da PCR para o gene *PvMSP1*

Após a extração de DNA das amostras com a utilização de kit *Charge switch* gDNA Blood kit (Invitrogen), foram obtidos a amplificação com primers PvF1 e PvR9 em 7 amostras positivas para o bloco 2, como podemos observar na figura 9.

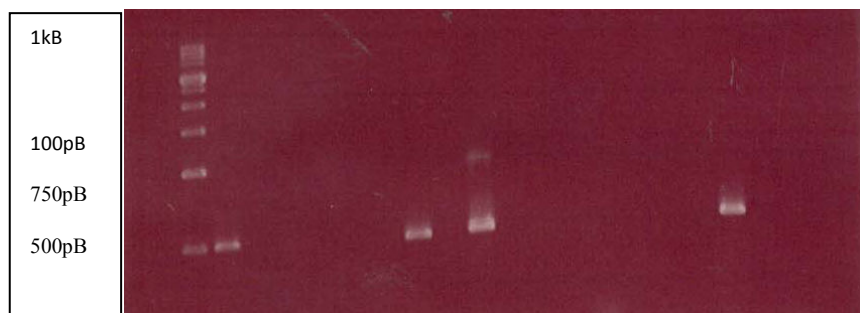


Figura 9 – Resultado da PCR para o bloco 2 com fragmentos de cerca de 500PB.). O Ladder comercial de 1kB Ludwig foi utilizado como Padrão de Peso Molecular visualizado na primeira canaleta do gel de agarose 1,5%.

4.3. Extração de DNA plasmidial

O produto foi clonado vetor Topo (invitrogen) e após a ligação, os plasmídios foram introduzidos em linhagem TOP 10 F' de *Escherichia coli* por transformação. Colônias foram selecionadas e após PCR confirmatório, os plasmídios foram extraídas em kit minipreparação da (Qiagen) de 7 amostras, resultando em um total de 70 colônias (10 colônias de cada amostra). A figura 10 mostra o perfil eletroforético de alguns plasmídios recombinantes de duas amostras.

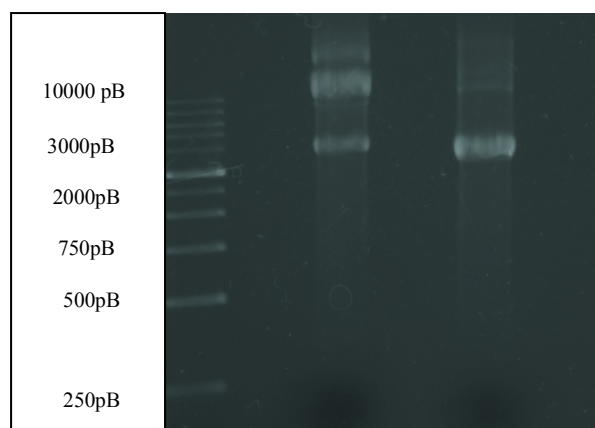


Figura 10- Resultado da extração plasmidial (Mini prep) referente às amostras 10 e 15. O Ladder comercial utilizado como Padrão de Peso Molecular foi 1kb DNA ladder Ludwig Biotec visualizado na primeira canaleta do gel de agarose 0,8%.

4.4. Purificação de Plasmídeo

O produto da extração plasmidial foi purificado com kit comercial MiniPrep (Qiagen). Abaixo podemos visualizar o resultado da purificação plasmidial.

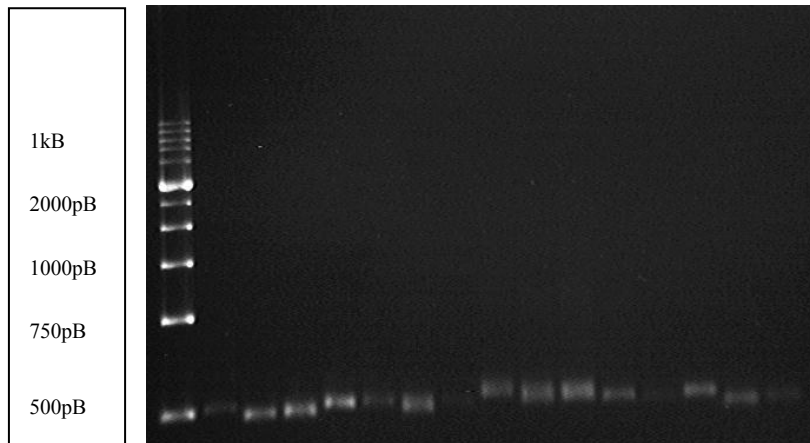


Figura 11- Resultado da purificação de DNA plasmidial utilizando kit comercial MiniPrep(Kiagem). O Ladder utilizado como Marcador de Peso Molecular foi o de 1KB.

4.5. Sequenciamento do fragmento

A Figura 11A mostra a seqüência de letras na cor azul, que segundo o programa indica maior qualidade e portanto confiável. Em 11B, está apresentada uma parte do perfil eletroferograma, com os picos bem definidos. Segundo os autores do programa, estas seqüências são de altíssima qualidade.



Figura 12 – Figura esquemática mostrando um eletroferograma de amostra seqüenciada e o padrão de qualidade da mesma.

4.6. Alinhamento e busca por similaridade com sequências do bloco 2 disponíveis no banco de dados do NCBI

Após obtidas, as sequências foram submetidas ao programa Blast (Basis Local Alignment Search Tool) no endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. A sequência da amostra 10 apresentou similaridade de 100% e valor esperado (e-value=zero) GQ 890943 correspondente a ao gene MSP1 do isolado CTRC 8 de *P. vivax* (Figura 12-A). E quando se alinhou uma sequência da amostra 10 com sequências do bloco 2 disponibilizadas no banco de dados do NCBI, foram selecionadas através do programa blast (n) cepas com e-value igual a zero provenientes de diferentes áreas geográficas, como podemos observar na tabela 1.

A sequência da amostra 15 também apresentou uma similaridade 100% com a sequência cujo código é AF435629 de MSP-1 de origem *Plasmodium vivax* isolado BP63 (Figura 12-B) e valor esperado (e-value) igual a zero, confirmando a identidade de ambas as sequências com a região do Bloco 2 de *P. vivax*.

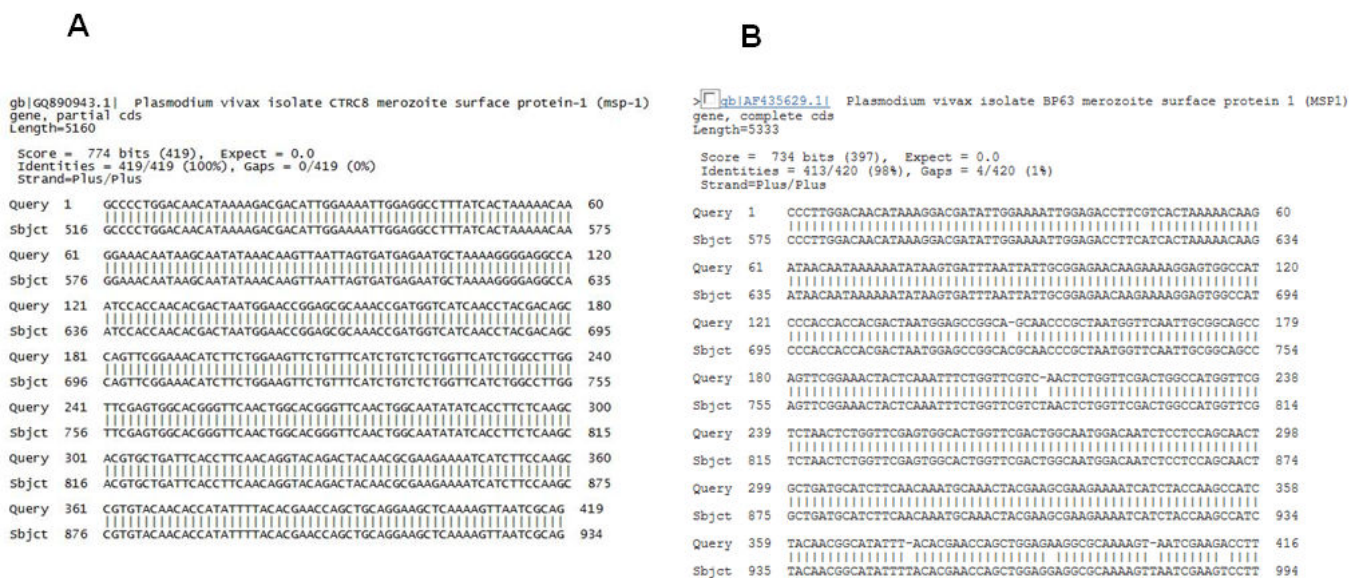


Figura 13 .Resultado da pesquisa de similaridade no programa Blast (Genbank). As sequencias da amostra 10 (A) e 15 (B) que foram submetidas a pesquisa de similaridade no programa BLAST do site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

4.7. Mutações, deleção e eventos de recombinação gênica

Para facilitar a observação de eventos de recombinação foram comparadas as seqüências de aminoácidos dos isolados (figura 1A). Duas trocas marcantes foram observadas ao longo da região de repetição, sendo a primeira: IKDDIG – LEAFITKNKETTISNINKLSDENAKRGQSTNT de isolados de 80 e 2. Outro evento de recombinação foi observada a jusante da região de repetição na sequência de aminoácidos: SSTNANYEAKKIYQAIY-GIFTNQLLEEA entre isolados 80 e 59. Ambas as regiões polimórficas do bloco 2, foram confirmados como locais de recombinação por análise das seqüências de DNA SP-5.

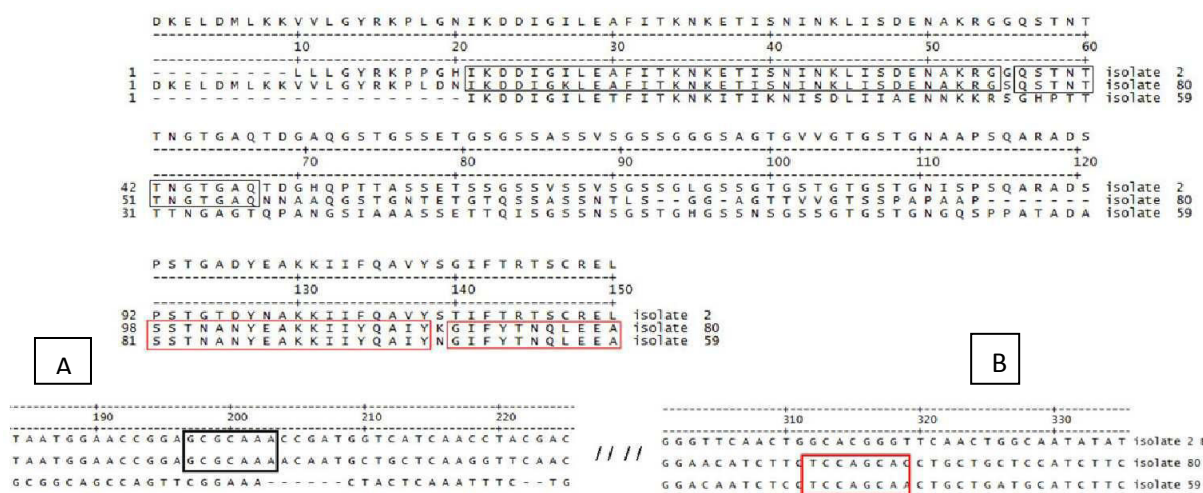


Figura 14- Sequencias homólogas entre diferentes isolados com possíveis pontos de recombinação. Em (A) podemos observar mudanças no alinhamento de seqüências homólogas dos isolados (2, 80 e 59). O retângulo azul mostra mudanças entre os isolados 2 e 80 . O retângulo vermelho mudanças entre os isolados 59 e 80. Em (B) pode-se notar dois locais de recombinação (quadrados azul e vermelho) utilizando o programa DNASP.

Substituição de nucleotídeos foi o evento mais freqüente, com um alto número de substituições dimórficas. Para cada isolado, doze colônias foram seqüenciadas. Nos isolados 10 e 15 foram verificadas substituições nucleotídicas na região do bloco 2 (figura 12A,B). A referência usada para comparar as seqüências das colônias do isolado 10 foi AF435637. Inserções pontuais e deleções também foram observados, porém em menor quantidade (figura 13). Das quatro mutações que ocorreram com deleção de nucleotídeos, as posições dos nucleotídeos 912 e 916 estavam dentro do bloco 2 e as posições 939 e 940 estavam na interespecie

observadas no bloco 2 (ICB-2). Um maior número de mutações pontuais foram observados em doze colônias de isolados 10 e 15 (figura 13). Dessas mutações a maioria era de substituição de nucleotídeo dimórfica. Além disso observou-se uma supressão de nucleotídeos. A grande maioria de substituições pontuais foram encontradas no bloco 2.

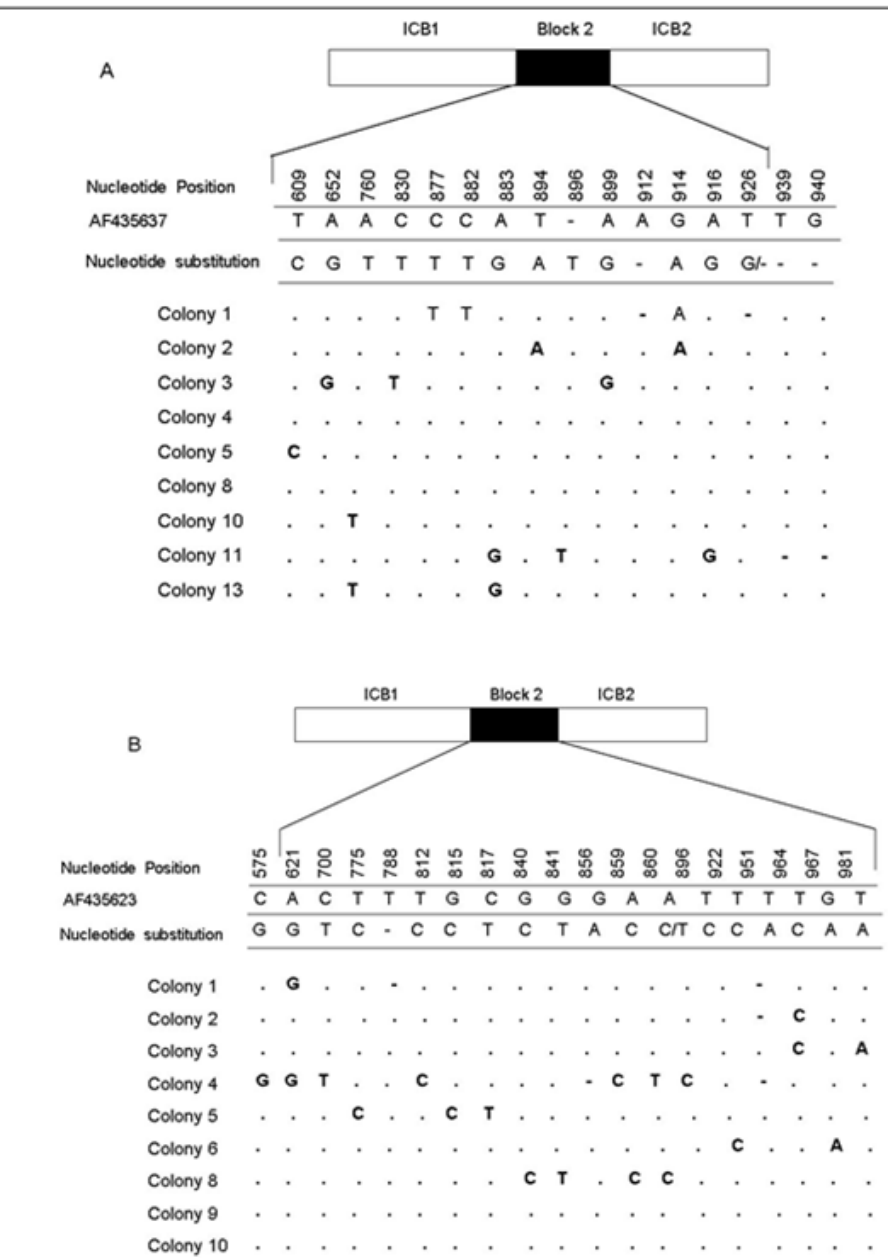


Figura 15 – Diversidade nucleotídica por mutações sinônimas e não sinônimas gerando polimorfismo na região do bloco 2. As seqüências que codificam os blocos conservados entre as espécies (ICB 1 e 2) foram examinadas. A área do retângulo é a região do 2 altamente polimórfica e rica em repetições. Análise das seqüências revelou substituições de nucleotídeos na região do bloco 2 para as amostras 10 e 15.

4.8. Cálculo da distância genética e confirmação de infecções multiclonais.

Na Tabela 1 podemos observar com base na distância genética entre as seqüências das diferentes colônias bacterianas carregando fragmento do Bloco 2 clonado no vetor Topo. Dentre as dez colônias bacterianas provenientes da amostra 10 foi possível distinguir 5 haplotipos diferentes. O cálculo da distância genética entre essas colônias mostrou que, dentro desta amostra 10 foi detectada um único alelo do Bloco 2 pertencente a GQ 890943 correspondente a ao gene MSP1 do isolado CTRC-8 de *P. vivax* da Tailândia (Jongwutiwes, S. and Putaporntip, C. 2010), disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery> e que sofreu mutações pontuais que resultaram na formação de 5 haplótipos deste alelo.

Tabela1- Distância genética entre nove colônias de clones recombinantes *PvMSP1* provenientes da amostra 10.

	1	2	3	4	5	8	10	11	13
1									
2	0,005								
3	0,007	0,012							
4	0,002	0,007	0,010						
5	0,000	0,005	0,007	0,002					
8	0,000	0,005	0,007	0,002	0,000				
10	0,005	0,010	0,012	0,002	0,005	0,005			
11	0,002	0,007	0,010	0,000	0,002	0,002	0,002		
13	0,005	0,010	0,012	0,002	0,005	0,005	0,000	0,002	

Distribuição haplotípica: Número de haplotipos = 5; Taxa de diversidade haplotípica (Hd): 0,8611

Haplotipo_1: 3 [1 5-8]; Haplotipo_2: 1 [2]; Haplotipo_3: 1 [3]; Haplotipo_4: 2 [4 11] e Haplotipo_5: 2 [10 13]

A Tabela 2 mostra também a distancia genética das colônias bacterianas carregando o produto de PCR do bloco 2 do isolado 15. As seqüências foram correspondentes pertencente a uma seqüência completa do gene MSP1 numero AF435623 de origem do Brasil *Plasmodium vivax* isolate BP13 (PUTAPORNTIP *et al*, 2002)

Tabela 2- Distância genética entre treze colônias de clones recombinantes PvMSP1 da amostra 15.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1													
2	0,000												
3	0,000	0,000											
4	0,067	0,067	0,067										
5	0,015	0,015	0,015	0,078									
6	0,000	0,000	0,000	0,067	0,015								
7	0,006	0,006	0,006	0,070	0,009	0,006							
8	0,012	0,012	0,012	0,078	0,015	0,012	0,006						
9	0,009	0,009	0,009	0,078	0,024	0,009	0,014	0,021					
10	0,003	0,003	0,003	0,064	0,018	0,003	0,009	0,015	0,012				
11	0,012	0,012	0,012	0,078	0,015	0,012	0,006	0,003	0,021	0,015			
12	0,006	0,006	0,006	0,074	0,021	0,006	0,012	0,018	0,015	0,009	0,018		
13	0,000	0,000	0,000	0,067	0,015	0,000	0,006	0,012	0,009	0,003	0,012	0,006	

Distribuição haplotípica: Número de haplótipos = 9; Diversidade de haplótipos = 0,8718

Haplótipo_1: 5 [1-3 6 13]; Haplótipo_2: 1 [4]; Haplótipo_3: 1 [5]; Haplótipo_4: 1 [7];

Haplótipo_5: 1 [8]; Haplótipo_6: 1 [9]; Haplótipo_7: 1 [10]; Haplótipo_8: 1 [11]; Haplótipo_9: 1 [12]

Na Tabela 2 podemos observar de forma semelhante que a distância genética entre as seqüências das diferentes colônias bacterianas distinguiram 9 haplótipos diferentes.

4.9. Mutações sinônimas e não sinônimas e predição de epítomos em haplótipos das amostras.

O alinhamento das seqüências demonstrou outro resultado interessante: Varias mutações sinônimas e não sinônimas ao longo de um trecho relativamente pequeno de DNA (Figura 13).

Os haplótipos do isolado 10 tiveram seis mutações, cinco não-sinônimas e uma sinônima, enquanto que no isolado 15 o número de mutações foi bem maior, quatorze, sendo 7 não-sinônimas e 7 sinônimas.

As seqüências de DNA foram traduzidas em aminoácidos e alinhadas através do programa MegAlign do pacote DNASTAR (Lasergene) para que pudéssemos avaliar a localização das mutações não sinônimas em relação a predição de

epítomos (Figura 14). A análise de predição se baseou no mapeamento e superposição das amostras 10 e 15 em várias sequencias lineares de tamanho de 20 aminoácidos que são preferencialmente ligadas nas moléculas do MHC de Classe II, usando através de análises computacionais baseadas em matrizes quantitativas (STURNIOLO *et al.* 1999). A previsão de epítomos lineares de células B e T foi realizado nas duas amostras utilizando dois software BcPred (Elmanzalawy *et al.*, 2008) e Propred (Sturniolo *et al.*, 1999). A diversidade genética mostrou mais mutações não sinônimas do que substituições sinônimas (figura 17). As predições realizadas pelo BcPred e ProPred na região em estudo mostraram que maior parte das mutações não sinônimas nas amostras 10 e 15 estavam localizadas nos domínios previstos como epítomos B e T (figuras 18 e 19, respectivamente). O resultado da análise é localização das regiões que se ligam promiscuamente a várias moléculas MHC e assim serem úteis na seleção de candidatos à vacina.

A

DKELDM LKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLEAFITKNKETISNINKLISDENAKRGGQSTNTTNGTGAQTDGHQP
 TTASSETSSGSSVSSVSGSSGLGSSGTGSTGTGSTGNISPSQARADSPSTGTDYNAKKIIFQAVYNTIFYTNQLQ

B

KELDM LKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLETFITKNKITIKNISDLIAENKKRSGHPTTTTNGAGTQPANGSIAAASSE
 TTQISGSSNSGSTGHGSSNSGSSGTGSTGNGQSPPATADASSTNANYEAKKIYQAIYNGIFYTNQLEEAQKLEIVL
 EKRVKVLKE

Figure 16. Localização das mutações não-sinônimas relacionada a predição linear de epítomos B e T. Predição de epítomos B lineares foi realizada e sublinhada por barras (Larsen and Nielsen, 2006). Diferentes ligações aos epítomos das células T foram preditos para todos os alelos HLA-DRB acessíveis dentro do ProPred usando um servidor que prediz a ligação peptídica ao MHC de classe II (Singh and Raghava, 2001). Nós observamos que muitos epítomos de célula T (letras azul) com resíduos ancorados (letra vermelha). A localização das substituições não sinônimas foram representadas por círculos pretos. A) Haplótipo do isolado 10. B) Haplótipo de isolado 15.

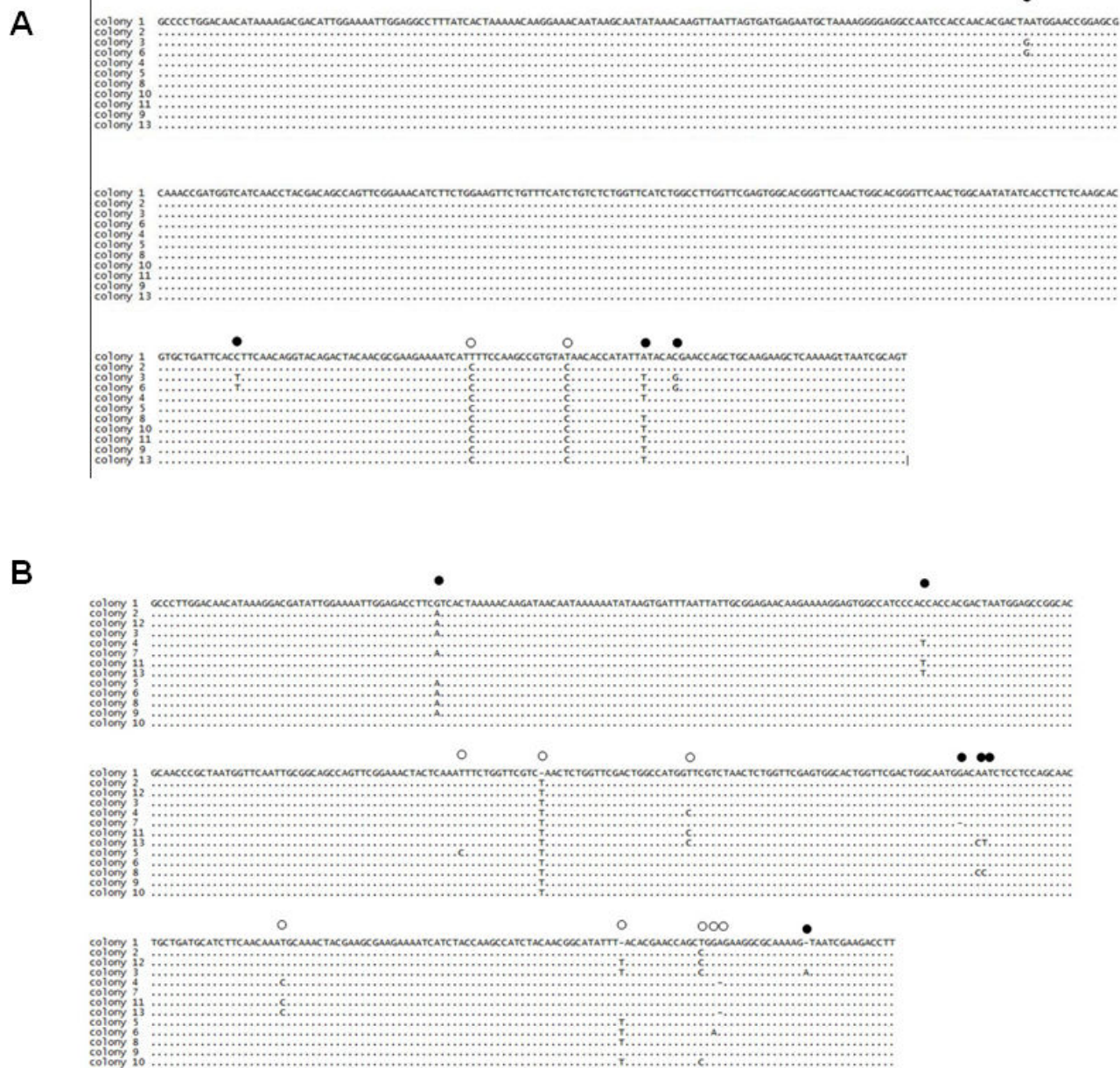


Figura17. Resultado do alinhamento dos diferentes haplotipos referentes as amostras 10 e 15 do bloco 2. A) Alinhamento dos haplotipos da colônia 10. B) Alinhamento dos haplotipos da colônia 15. Circulo preto= mutações não sinônimas. Circulo branco= mutações sinônimas

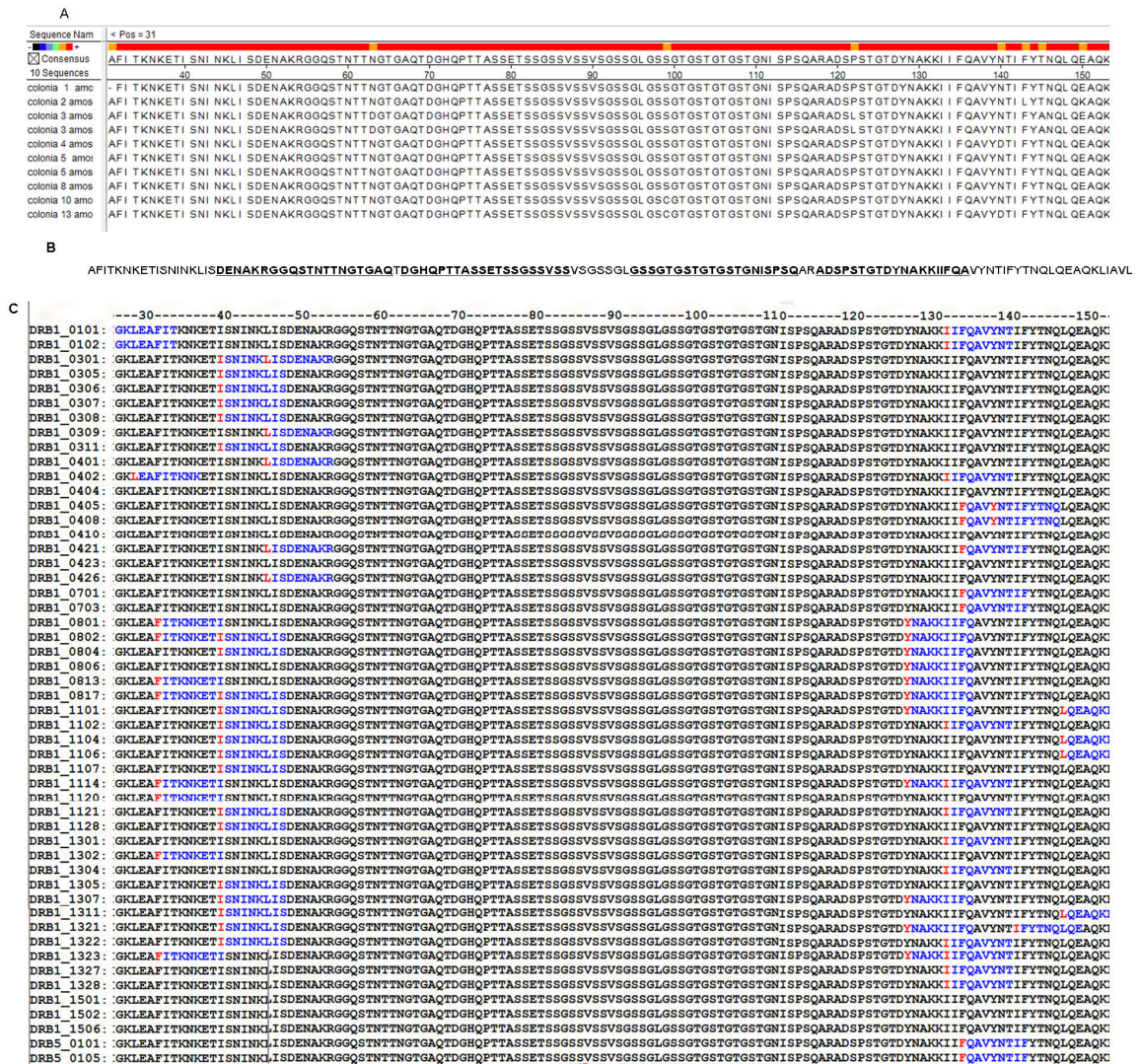


Figura 18. Mutações não sinônimas e predição de epitopos dos haplotipos em isolados da amostra 10. A) Alinhamentos dos haplótipos da amostra 10 realizados pelo programa MegAlign do DNASTAR (Lasergene) mostram as posições similares e alteradas. Na parte superior a esquerda de cada alinhamento esta definido por espectro de cores o nível de consensualidade entre a posição de um resíduo em uma sequência em relação as outras sequências. Quanto maior o consenso entre os aminoácidos de uma posição, a cor indicada acima do alinhamento é vermelho. Do laranja para o preto o nível de divergência entre as sequências fica maior gradativamente. Exemplo: nos alinhamentos as sequências estão empilhadas e na parte de cima do alinhamento há uma barra vermelha. Ela indica que os aminoácidos são os mesmos em todas as sequências. Quadrado laranja ou verde indica que pelo menos uma sequência houve a substituição do aminoácido em alguma sequência; B) Análise de predição de epitopo pelo programa BCPred. Determinação dos epitopos de células B e T. C) Análise de predição das regiões ligantes ao MHC de classe II dos haplotipos da família HLA DR-B1.

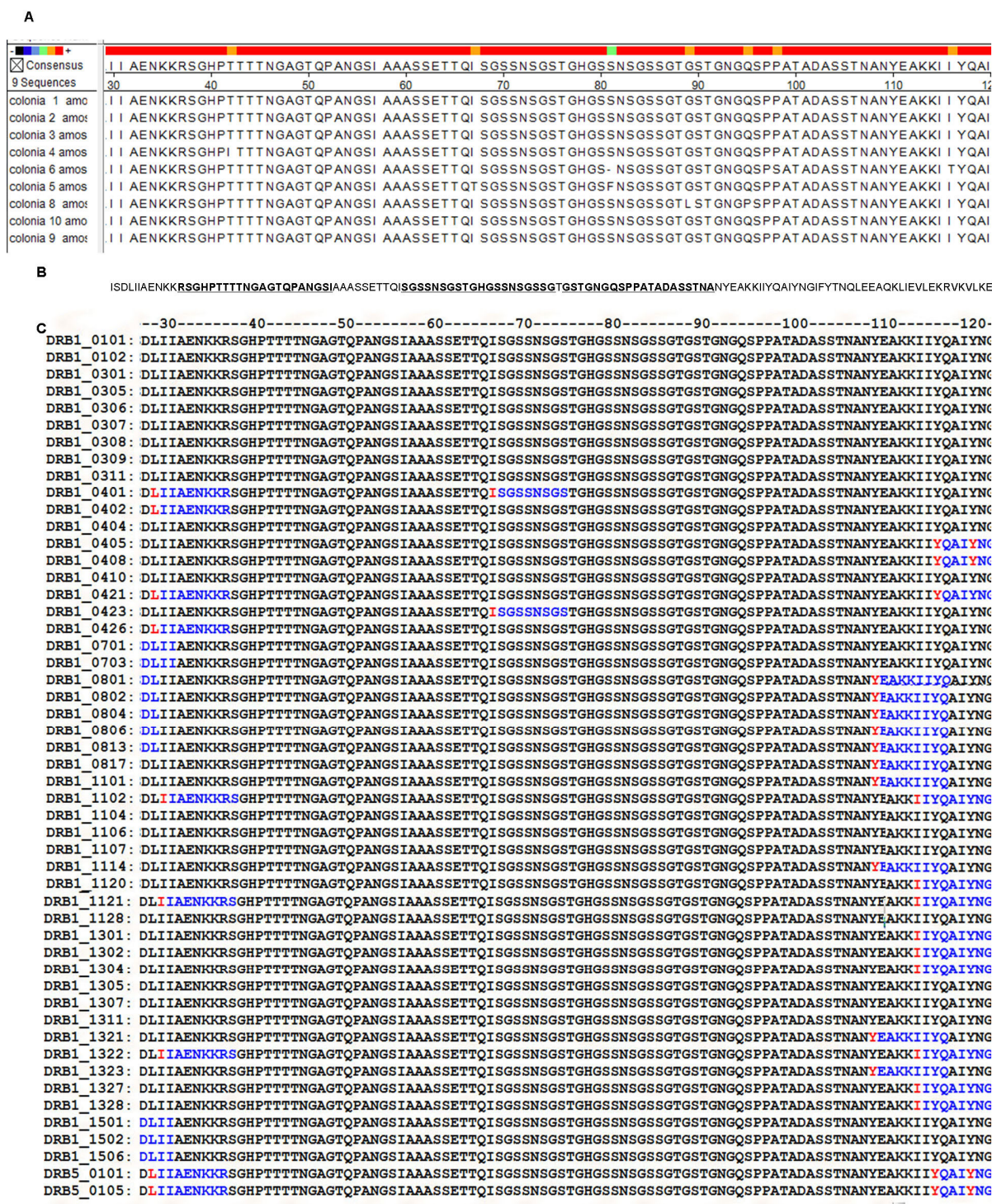


Figura 19. Mutações não sinônimas e predição de epítopos dos haplotipos em isolados da amostra 15. A) Alinhamentos dos haplotipos da amostra 15 realizados pelo programa MegAlign do DNASTAR (Lasergene) mostram as posições similares e alteradas. Na parte superior a esquerda de cada alinhamento esta definido por espectro de cores o nível de consensualidade entre a posição de um resíduo em uma sequência em relação as outras sequências. Quanto maior o consenso entre os aminoácidos de uma posição, a cor indicada acima do alinhamento é vermelho. Do laranja para o preto o nível de divergência entre as sequências fica maior gradativamente. Exemplo: nos alinhamentos as sequências estão empilhadas e na parte de cima do alinhamento há uma barra vermelha. Ela indica que os aminoácidos são os mesmos em todas as sequências. Quadrado laranja ou verde indica que pelo menos uma sequência houve a substituição do aminoácido em alguma sequência; B) Análise de predição de epítopo pelo programa BCPred. Determinação dos epítopos de células B e T. C) Análise de predição das regiões ligantes ao MHC de classe II dos haplotipos da família HLA DR-B1.

5. DISCUSSÃO

Nas duas amostras analisadas ficou claro o predomínio de alguns clones específicos. O predomínio mais evidente se viu com a amostra 15, na qual o haplótipo 5 apareceu 5 vezes enquanto todos os outros apareceram apenas uma vez. Com a amostra 10, a predominância foi menos evidente, pois o haplótipo 1 apareceu 3 vezes, os haplótipos 4 e 5 apareceram 2 vezes cada um. Um resultado semelhante foi observado em outros estudos, os quais demonstram que dentro do hospedeiro, clones distintos competem entre si uns predominando mais em detrimento de outros (BELL A.S *et al*, 2006).

Ao comparar as sequências de aminoácidos obtidas do seqüenciamento dos plasmídeos pertencentes às colônias das amostras 10 e 15, foi observado a existência de eventos de recombinação entre os isolados (figura 11A e B). Foram observadas inserções pontuais e deleções em amostras de plasmídeos pertencentes a amostra 10 e 15 (figura 14 e 15). Quase todas as mutações pontuais ocorreram na região polimórfica do bloco 2, apoiando a idéia de que o nível de polimorfismo seriam afetadas pelo nível de recombinação alélica sob pressão seletiva e acredita-se que esses polimorfismos tem se mantido ao longo dos anos também por seleção natural positiva (TANABE *et al*, 2007).

Para mecanismos de evasão, um simples evento, como recombinação genética pode acarretar alterações em um número maior de aminoácidos, e também por ocorrer em algumas ordens de magnitude com mais freqüência do que as mutações. Foi observado neste trabalho muitas mutações pontuais, incluindo inserções, deleções e substituições. As substituições foram mais freqüente e do tipo dimórfica. No entanto, uma grande porcentagem de substituições não sinônimas dentro dos blocos conservados resulta em mudança na ligação com os alótipos do HLA de classe II. Assim, os polimorfismos nestes epítomos da células B e T habilitariam o parasita a escapar da resposta imune (TANABE *et al*, 2007). Dessa forma um grande número de substituições não-sinônimas de nucleotídeos pode influenciar modificações no reconhecimento de epítomos de células B e T. Estudos sobre diversidade genética, com base em mutações e recombinação tem mostrado que essa variação pode resultar em fuga da imunidade do hospedeiro (FERREIRA *et al*, 2004).

As mutações pontuais encontradas nas colônias de clones recombinantes pertencentes a cada amostra podem ou não alterar aminoácidos que estão dentro dos epítomos reconhecidos pelas moléculas de HLAs existentes no indivíduo. Os HLAs são os antígenos de leucócitos humanos, conhecidos como apresentadores de antígenos aos linfócitos T. Esses HLAs são polimórficos, de modo que um ser humano herda um conjunto de moléculas HLA paternas e maternas. Surpreendentemente os dados analisados mostraram uma proporção maior de mutações pontuais não sinonímias dentro dos epítomos selecionados por dois programas que predizem a força de ligação entre uma suposta sequência peptídica e um banco de dados contendo moléculas HLAs de uma família gênica conhecida como HLA-DR-B1. Os nossos resultados mostraram que todas as mutações não sinônimas do isolado 10 estavam localizadas nos epítomos das células B ou T ou em ambos.

Em contraste as substituições não-sinônimas foram preferencialmente distribuídas na região rica em repetição que continha os epítomos da célula B preditos por BepiPred (LARSEN, JEP; NIELSEN, OL. 2006). Os nossos dados sugerem que as mutações pontuais não silenciosas no bloco 2 polimórfico do gene MSP1 eram aleatórias, mas por não serem raros os eventos e por estas mutações estarem localizadas estrategicamente nos epítomos de células B que reconhecem a MSP1, devem induzir variantes intra-espécie que podem permitir que o parasita venha a escapar da resposta imune do hospedeiro.

Observamos com grande detalhe que as mutações pontuais geram polimorfismos, porém, ainda não se sabe com clareza de detalhes de que forma essas substituições de nucleotídeos no locus do bloco 2 foram geradas e mantidas em infecções naturais de *P.vivax*, nessa área central da Amazônia, onde a transmissão da malária baixa prevalece. Enquanto essas mutações forem relativamente raras, conduziram a mutações pontuais. Se ocorrer de uma forma não aleatória em sequências que codificam para epítomos das células B ou T, esse evento será vantajoso para o parasita.

Mudanças na estrutura primária da Proteína MSP1, conseqüentemente, levam a alterações na estrutura secundária do antígeno MSP1. Em virtude de a região em estudo ser altamente polimórfica e tendo por base os estudos realizados

que comprovam a imunogenicidade da região N-terminal da MSP1 em infecções maláricas naturais ocasionadas por *Plasmodium vivax*, o desenvolvimento de múltiplos alelos MSP1 bloco 2 abre um campo de pesquisa que visa o desenvolvimento de uma vacina que incluirá seqüências isolado-específica, ou seja, a partir de diferentes tipos e alelos que ocorrem naturalmente, afim de amplificar os anticorpos direcionados contra cada variante. A partir desses resultados, serão construídas proteínas recombinantes contendo a diversidade genética encontrada nessas cepas. Posteriormente, possibilitará a análise do nível de anticorpos contra esses epítomos recombinantes e finalmente, a médio e longo prazo, realizar testes para avaliar o potencial de anticorpos contra esses epítomos presentes na molécula recombinante na inibição do merozoíto no eritrócito.

5. CONCLUSÃO

1. Nossos resultados mostraram que as mutações pontuais encontradas para o bloco dois do gene *PvMSP1* podem gerar polimorfismos nos epítomos dos HLAs de classe dois resultando em diversidade antigênica, sendo portanto, um importante mecanismo de escape do parasita.
2. Nossos resultados mostraram que as mutações pontuais são um mecanismo importante na geração de novos haplótipos. Portanto, a compreensão dos mecanismos geradores de diversidade genética e a dinâmica das cepas de *P. vivax* circulantes em determinadas regiões, tornam-se extremamente importantes para o desenvolvimento de uma vacina.
3. Tendo em vista que o gene que codifica a MSP1 em *Plasmodium* expressa apenas uma cópia do gene por parasita, considera-se que método utilizado foi satisfatório no diagnóstico de multiclonalidade das infecções em *P. vivax*.
4. Na análise das sequências um grande número de substituições nucleotídicas foram encontradas na região do bloco 2, mostrando que é o local onde ocorre grande variação genética em MSP1 de *P. vivax*, principalmente sob a forma de substituições dimórficas, indicando que uma pressão seletiva é que atua sob a região polimórfica do bloco 2.
5. Neste trabalho podemos observar um grande nível de diversidade genética no bloco 2 do *PvMSP1* na Amazônia Central, na qual mutações, seleção natural e recombinação parecem alimentar e sustentar a habilidade do parasita de evadir do sistema imune. Esses estudos poderão possibilitar a realização de ensaios de uma vacina multimérica contra *P. vivax* baseados na produção de proteínas recombinantes contendo a diversidade genética encontradas nessas cepas.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDRE, M.A.A. Estudo clínico e epidemiológico dos casos graves de malária *vivax* em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Dissertação de Mestrado. FMT/AM. 2004.
2. BABIKER, H. A. *et al.* Random mating in a natural population of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 1994, 109: 413-421.
3. BARATA, R.C.B. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Cadernos de Saúde Pública* 11:128-136, 1995.
4. BARCKEY, V. C. *et al.* Mixed allele malaria vaccines: Host protection and withstanding host selection. *Vaccine*, 2008. 26(48-2): 6099- 6107.
5. BELL, A.S. *et al.* Withstanding –host competition in genetically diverse malaria infections: parasite virulence and comparative success. *Evolution* 2006, 60(7):1358-1371.
6. BERZINS, K.; ANDERS, R. F. Malaria molecular and clinical aspects. Haworth Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. The malarial antigens, p.181,216. 1999.
7. CARLTON, J. M. *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* Vol. 455/9. 2008.
8. CONWAY D. J. *et al.* A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med*, 2000.6: 689-692.
9. CUI, L. *et al.* Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in western Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2003. 68:613-619.
10. DAY, K. P.; MARSH, K. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Immunol.* 129: p. A68- A71. 1991.
11. DEL PORTILHO H.A. *et al.* *Plasmodium vivax*: cloning and expression of a major blood-stage surface antigen. *Exp. Parasitol.* 63:346-353. 1988.
12. DEL PORTILHO H.A. *et al.* Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. 88(9): 4030-4.

13. DEL PORTILLO H. A. *et al.* A superfamily of variant genes encoded in subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 410:839-842. 2001
14. DE ROOD J. C. *et al.* Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102: 762-7628.
15. EL- Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V (2008) Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit* 21:243-25
16. EMBRAPA. Análise de eletroferograma. Disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/phph.pl>
17. ESCALANTE A. A. *et al.* Assessing the effect of natural selection in malaria parasites. *Trends Parasitol*, 2004. 20(8): 388-95.
18. FERREIRA, M. U. *et al.* Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. p.987-995. 2004.
19. FERREIRA, M. S. *et al.* Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene* . 304:65-75. 2003.
20. FREEMAN, R. R.; HOLDER, A. A. Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J. Exp. Med.* 158: p. 1647-1653. 1983.
21. GUERRA C. A. *et al.* The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLOS*. 2010.
22. GIBSON, H. L. *et al.* Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50: 325-333. 1992.
23. GOOD, M.F. *et al.*, 2005. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: Implications for vaccine research. *Annu. Rev. Immunol.* 2005.23:69-99.
24. HERRERA, S.; GORRADIN, G.; HERRERA, M.A. An update on the search for a *Plasmodium* vaccine. *Trends Parasitol.* 23: 122-128. 2007.
25. HOLDER, A.A; RILEY, E. M. Human immune response to MSP1. *Parasitol Today* , 1996. 12, 173-174.

26. HOLDER, A. Malaria vaccines: Where next? *Plos Patogens* 5 (10) e1000638, doi: 10.1371/journal.ppat.1000638.
27. LARSEN, JEP; NILSEN, OL. Improved method for predicting linear B cell epitopes *Immunome Research* 2006; 2:2.
28. MACKINNON, M. J.; READ, A. F. Immunity promotes virulence evolution in a malaria model. *PLOS Biol* 2004; 2:1-7.
29. MANCILLA, L. I. *et al.* *Plasmodium vivax*: dimorphic DNA sequences from the MSP1 gene code for regions that are immunogenic in natural infections. *Exp. Parasitol.* 1994; 148-158.
30. MILLER, L.H. *et al.* The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415 : 673-679. 2002
31. MINISTÉRIO DA SAÚDE 1996, 2005, 2009. Disponível em: www.saude.gov.br/ms
32. NCBI. BLASTn e BLASTp. Comparação de sequências nucleotídicas e protéicas. Disponível em : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
33. NCBI. Busca de sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>
34. NOGUEIRA, P. A. , *et al.* A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N-terminus but not the C-terminus of merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 74: p. 2726- 2733. 2005.
35. OLIVEIRA, T. R., *et al.* Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic áreas of Brazil. *Malaria Jornal.* 5: 83. 2006.
36. POLLEY, SD. , *et al.* Orthologous genes sequences of merozoite surface protein 1(MSP1) from *Plasmodium rechei* and *Plasmodium galinaceum* confirm an ancient divergence of *Plasmodium falciparum* alleles. *Mol Biochem Parasitol.* 2005. 142(1): 25-31.
37. PREMAWANSA *et al.* Recombination between potential allelic types of the merozoite surface protein MSP-1 in parasites isolated from patients. *Exp. Parasitol.* 76: 192- 199. 1993.

38. PRICE, R. N. *et al.* Vivax Malaria: Neglected and not benign. *Am.J. Top Med Hyg.* 77(6): 79-87.2007.
- 39.PUTAPORNTIP *et al.* Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Mol Biochem Parasitol*, 1995. 84(1): 49-56.
40. PUTAPORNTIP *et al.* Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 16348 – 16353. 2002.
41. PUTAPORNTIP *et al.* Ancient common ancestry of the merozoite surface protein-1 of the *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146: 105- 108. 2006.
42. SACHES J; MALANEY P. The economic and social burden of malaria. *Nature.* 416 (6881):581. 2002.
43. SARAIVA, M.G.G *et al*, 2009. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*42(5): 515-522, set-out, 2009.
44. SAUL, A. Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Curr Opin Infect Dis.* 2007. 20(5): 476-81.
45. SINGH, H. and HAGHAVA, G.P. ProPred: Prediction of HLA – DR binding sites. *Bioinformatics.* 2001; 17(12):1236-7.
- 46.STURNIOLO, T.; Bono, E.; RADDRIZZANI,L.; TUERECI, O.; SAHIN,U.; BRAXENTHALER, M.; Gallazi, F.; PROTTI, M. P.; SINIGAGLIA, F.; HAMMER, J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand database using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat. Biotechnol.*17.555-561(1999).
47. SULLIVAN, David. Uncertainty in mapping malaria epidemiology: implications for control.Oxford University press.vol.32, 2010.
- 48.TAMURA, K.*et al.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993.

49. TAMURA, K., DUDLEY, J., NEY, M., KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analyses (MEGA), software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* 24, 1596-1599.
50. TANABE, K. *et al.* Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Molec. Biol.* 1987. 195: 273 – 287.
51. TANABE, K. *et al.* Stable SNPs in malaria antigen genes in isolated populations. 2004. *Science* 303, 493.
52. TANABE, K. *et al.* Recent independent evolution of MSP1 polymorphism in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2007. 156, 74-79.
53. TAYLOR L. H. *et al.* Mixed genotype infections of malaria parasites: Withing – host dynamics and transmission success of competing clones. *Proc Biol Sci* 1997, 264 (1383): 927-935.
54. VIRIYAKOSOL, S. *et al.* Identificación de genótipos de cepas aisladas de *Plasmodium falciparum* mediante la reacción en cadena de la polimerasa y SUS posibles en estudios epidemiológicos. *Bol Oficina Saint Panam*, 1996. 120 (2).
55. WARGO A. R. Competitive release and facilitation of drug- resistant after therapeutic chemotherapy in a rodent malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(50): 19914-9.
56. WIJAYALATH, W. A. *et al.* Evidence for strain specific protective immunity against blood- stage parasites of *Plasmodium cynomolgi* in toque monkey. *Parasite Immunol.* 2008. 30 : (630-636).
57. YANG, C., *et al.* Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *saemuri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Inf. Immun.* 67: p. 342-349. 1999.
58. World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2011. Disponible en: WWW.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html
59. ZAKERI, S. *et al.* Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. *Trop Med Int Health*, 2006. Vol 2 no. 5, PP 729-737.

ANEXO 1



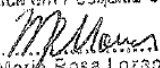
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 3640.0.000.115-07, intitulado: **“Dinâmica das infecções maláricas em comunidades do Amazonas sob aspecto de marcadores moleculares de parasitas e do polimorfismo de proteínas candidatas a vacinas”**, tendo como Pesquisador Responsável Paulo Afonso Nogueira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 22 de novembro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


Prof. Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora