

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EM FLUXO LATERAL PARA O
DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium falciparum***

LUIS ANDRÉ MORAIS MARIÚBA

**MANAUS - AM
2010**

LUIS ANDRÉ MORAIS MARIUBA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EM FLUXO LATERAL PARA O
DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium falciparum***

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Orientador: Dr. Paulo Afonso Nogueira

Co-Orientador: Dr. Patrícia Puccinelli Orlandi

**MANAUS - AM
2010**

À Deus,

À meus pais: José Luiz de Souza Mariúba,

Dulcinea Morais Mariúba,

À minha esposa: Sara Martins dos Santos Mariúba,

À minha filha: Lara Sofia Martins Mariúba,

E a todos meus familiares e amigos.

- Financiamentos para realização desta tese
 - FAPEAM
 - Projeto: “Desenvolvimento de insumos reagentes para diagnóstico rápido de Malária” (PPSUS/2006).
 - CNPq
 - Projeto: “Desenvolvimento de teste imuno captura rápido para diagnóstico de malária” (edital MCT/CNPQ/MS-SCTIE-DECIT 39/2005 SAÚDE AMAZÔNIA).
 - CAPES
 - Bolsa de estudos “Demanda Social” cedida através do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.
- Local de desenvolvimento da pesquisa
 - FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) – ILMD (Instituto Leônidas e Maria Deane), Biodiversidade e saúde.
- Parcerias
 - Instituto Butantan
 - Estágio em produção de anticorpos monoclonais realizado por um dos membros da equipe.
 - Posto de saúde Conte Teles e Fundação de Medicina Tropical
 - Fornecimento das amostras sanguíneas usadas neste trabalho.

Gostaria de deixar claro minha gratidão àqueles que contribuíram de alguma forma nestes três anos de trabalho aqui em Manaus.

Começo agradecendo meus pais, José Luis de Souza Mariúba e Dulcinea Morais Mariúba, duas pessoas que tenho como exemplo em minha vida de que trabalhando com seriedade, sem precisar bajular ninguém, podemos construir um futuro digno. Espero que tenha dado a vocês orgulho e saibam que sinto saudade, muita saudade.

Agradeço a Sara Martins dos Santos Mariúba, minha esposa e companheira para “tudo que der e vier”. Muitas teriam voltado para casa durante o primeiro ano aqui em Manaus, visto a falta de recursos que enfrentamos naquele período. Outras situações complicadas apareceram, porém ela manteve sua confiança no futuro que poderíamos construir juntos. Ano passado, fomos abençoados com nossa sorridente filha Lara Sofia Martins Mariúba, que completou nossa família e vem trazendo muita felicidade.

Sou grato também a meus familiares Clenyo Mariúba da Silva, Daniela Mariúba, Andrea Mariúba e Lenilde Martins pelas orações pedindo que tudo desse certo e que Deus guiasse nosso caminho. Saibam que rezo por vocês e por todos da mesma forma.

Agradeço a Dr^a. Patricia Puccineli Orlandi e Dr. Paulo Afonso Nogueira, por me darem uma oportunidade que mudou completamente minha vida. Sou muito grato por confiarem em meu trabalho, me ajudarem nas horas difíceis e por terem visto em mim uma capacidade que nem eu mesmo sabia ter. Espero que continuemos a sonhar juntos em muitos trabalhos.

Sou grato também a Diogo, Leidiane, Lenilson e Paula, pela amizade e ajuda nos momentos difíceis dentro e fora do laboratório. A meus amigos e colegas de laboratório Ivanilde, Janaína, Maria Carolina, Yury, Dona Jura (Juracy), Paty (Patricia Dantas), Giovanna e Natanael pela paciência e ajuda prestada. A Maria Edilene, Davi Borges e Luciana Pereira, os quais trabalharam com extrema dedicação na produção dos anticorpos monoclonais obtidos neste trabalho. A Enedina e Dr. Spartacos Astolfi Filho por permitirem as eventuais utilizações dos equipamentos da UFAM e orientações realizadas. Ao Dr. Roberto Senna por manter sua crença em nosso grupo. A FIOCRUZ, por ceder sua estrutura para realização deste trabalho, assim como as fontes de financiamento.

E por ultimo, porém mais importante, a Deus. Sei que o Senhor me escuta, guia meus passos e abençoa minha casa. Acredito plenamente ter sido o Senhor que me apontou os caminhos certos a seguir até chegarmos onde estamos.

OBRIGADO!

“Só Deus sabe o quanto eu corri,
E o que fiz pra chegar aqui.
Pra quem tem pensamento forte,
O impossível é só questão de opinião”
(Ferrera e Rocha; Chorão;)

RESUMO

Tradicionalmente, o diagnóstico confirmatório da malária é feito pelo exame microscópico do sangue. Logo, o diagnóstico da doença pode ser complicado com a falta de pessoas ou equipamentos necessários para a obtenção de um diagnóstico confiável e rápido. Por esta e outras razões, métodos rápidos, práticos e sensíveis vêm sendo desenvolvidos, como, por exemplo, as fitas imunocromatográficas.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema em fluxo lateral para o diagnóstico de malária causada por *Plasmodium falciparum*. Logo, anticorpos policlonais e monoclonais contra a proteína HRP2 (“Histidine rich protein 2”) de *Plasmodium falciparum* foram produzidos utilizando para isso uma proteína recombinante desta fusionada a uma cauda de glutationa-S-transferase (rHRP2-GST, obtida em trabalhos anteriores).

Após a obtenção dos hibridomas, apenas 20 responderam contra a proteína rHRP2-GST, e dentre estes apenas 4 apresentaram alguma reatividade contra a proteína nativa. O anticorpo monoclonal que melhor reagiu a este último ELISA e em um ensaio de imunofluorescência foi utilizado em um sistema de fluxo lateral padronizado nesta tese. Para esta padronização, foi montado primeiramente um sistema em fluxo lateral em formato competitivo seguido de um sistema em sanduíche utilizando anticorpos policlonais anti-rHRP-GST. Nos ensaios utilizando hemácias parasitadas por *P. falciparum*, foram obtidos resultados positivos (detecção da infecção na fita imunocromatográfica) usando os anticorpos policlonais. O sistema apresentou estabilidade dentro do período de teste, demonstrando assim que possivelmente, em um ambiente de produção controlado, este sistema em fluxo lateral poderia permanecer estável por um tempo satisfatório para sua comercialização.

Palavras-chave: Malária; HRP2; teste para diagnóstico rápido; anticorpos monoclonais; sistema em fluxo lateral.

ABSTRACT

Traditionally, confirmatory diagnosis of malaria is made by microscopic examination of blood. Therefore, the diagnosis of the disease may be complicated by the lack of people or equipment necessary to obtain a fast and reliable diagnosis, especially in areas of difficult access. For these and other reasons, rapid, practical and sensitive methods have been developed, such as immunochromatographic strips.

Therefore, this work aimed to develop a lateral flow system for the diagnosis of malaria caused by *Plasmodium falciparum*. So, polyclonal and monoclonal antibodies against the protein HRP2 (Histidine rich protein 2) of *Plasmodium falciparum* were produced using a recombinant protein that it fused to a glutathione-S-transferase (rHRP2-GST, obtained in previous work).

After hibridomas production, only 20 responded against the protein rHRP2-GST, and of these only four showed some reactivity against the native protein. The monoclonal antibody that reacted better on this last ELISA test and in an immunofluorescence was used on a lateral flow system standardized here. For this standardization, the system was first mounted in lateral flow competitive format followed by a sandwich system using polyclonal anti-rHRP2-GST. In assays using red blood cells parasitized by *P. falciparum*, positive results were obtained (detection of the infection in the immunochromatographic strip) using polyclonal antibodies. The system was stable within the test period, thus demonstrating that possibly in a controlled production environment, this lateral flow system could remain stable for a time suitable for marketing.

Keywords: Malaria; HRP2; rapid diagnostic test; monoclonal antibodies; lateral flow.

Figura 1 – Numero estimado de casos de malária no ano 2006.

Figura 2 - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária.

Figura 3 – Ciclo de vida do parasita da malária em humanos.

Figura 4 - Esquema de um sistema em fluxo lateral de tamanho 30x4 mm.

Figura 5 – Modo de ação da detecção de antígeno de um kit para diagnóstico rápido da malária.

Figura 6 – Diferenças na disposição e na geração de sinal entre o sistema em fluxo lateral competitivo e em sanduíche.

Figura 7 – Distribuição fenotípica do antígeno HRP2.

Figura 8 – Produção de anticorpos monoclonais.

Figura 9. Construção da proteína recombinante rHRP2-GST e verificação da purificação da proteína rHRP2-GST em um gel SDS-PAGE.

Figura 10 - Teste diagnóstico de malária falciparum (Hexagon/AUS).

Figura 11 – Mapa do plasmídeo pGEX-3x.

Figura 12 – Esquema da produção de anticorpos monoclonais.

Figura 13 – Procedimento realizado para teste em fluxo lateral competitivo com Anti-GST.

Figura 14. Esquemas da montagem e do teste fluxo lateral desenvolvido neste trabalho.

Figura 15 – SDS-PAGE das diferentes condições de purificação da proteína rHRP2-GST.

Figura 16 – Resultado da imunofluorescência realizada com o anticorpo monoclonal “7A” anti-HRP2.

Figura 17 – Purificação do anticorpo monoclonal Anti-GST de sobrenadante de cultura.

Figura 18 – Sistema em fluxo lateral utilizando monoclonal anti-GST.

Figura 19 – Resultados obtidos utilizando anticorpos policlonais no ouro coloidal e linha teste do sistema em fluxo lateral.

Figura 20 – Teste de estabilidade do ouro coloidal e fita imunocromatográficas preparadas.

Tabela 1 – Manifestações clínicas e laboratoriais da malária grave e complicada, causado pela infecção por *P. falciparum*.

Tabela 2 – Diagnóstico da malária – testes rápidos e microscopia – segundo algumas características e requerimentos.

Gráfico 1 – Casos de malária no Brasil entre os anos de 1999 e 2005.

Gráfico 2 - Ensaio da detecção da HRP-2 em plasma de pacientes infectados com malária causada por *P. falciparum*.

Gráfico 3 – Níveis de anticorpos detectados por ELISA em animais após imunizações.

Gráfico 4. Teste ELISA indireto dos sobrenadantes dos hibridomas.

Gráfico 5 - Seleção de hibridomas anti HRP2 nativo.

Gráfico 6 - Reatividade de 20 poços selecionados após diluição limitante.

Gráfico 7 – Reatividade observada nos quatro hibridomas monoclonais (1D, 4C, 7A e 8A) capazes de reconhecer a proteína HRP2 nativa.

Gráfico 8 – ELISA em formato sanduíche utilizando o anticorpo monoclonal anti-HRP2 “7A” contra diferentes amostras de pacientes (com diferentes parasitemias) com *P. falciparum*, indivíduos sadios e amostra com *P. vivax*.

- BSA – Albumina de soro bovino
- CEM – Campanha de Erradicação da Malária
- DMEM – “Dulbecco's modified Eagle's medium”
- D.O. – Densidade Óptica
- EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid”
- ELISA – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
- GST – Glutathione-S-Transferase
- HAT – Hypoxanthine Aminopterin Thymidine
- HRP2 – “Histidine rich protein 2”
- IFA – “Imunofluorescence assay”
- IgG – Imunoglobulina G
- IPTG – “Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside”
- kDa – Kilo daltons
- LB – Luria Bertani
- mAb – Anticorpo monoclonal (“monoclonal antibody”)
- NaCl – Cloreto de Sódio
- nm – Nanômetros
- PBS – Tampão fosfato-salina
- PCMAM – Projeto de controle da malária na bacia amazônica),
- PCIM – Programa de controle integrado da Malária)
- PEG – Polietilenoglicol
- pH – Potencial hidrogênio iônico
- PIACM – Plano de Intensificação de Controle da *Malária* na Amazônia
Legal
- PMSF – Phenylmethanesulfonylfluoride
- PNCM – Programa Nacional de Controle da Malária
- SIVEP – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da
Malária
- SN – Sobrenadante
- SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
- RPM – Rotações por minuto
- rHRP2-GST – Proteína recombinante HRP2 fusionada a cauda GST
- TDR – Teste para diagnóstico rápido
- TMB – Tetrametil Benzidina Dihidroclorato

WHO – World Health Organization

cm – Centímetros

g – força g

g/L – gramas por litro

°C – Grau Celsius

M – Molar

mM – Milimolar

ml – Mililitro

μL – microlitro

μg – micrograma

pb – pares de bases

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO

<i>1.1 Breve Histórico sobre a Malária</i>	23
<i>1.2 Epidemiologia da malária no mundo</i>	24
<i>1.3 Malária no Brasil</i>	26
<i>1.4 Ciclo de vida e aspectos clínicos</i>	30
1.4.1 Agravamentos em infecções causadas por <i>P. falciparum</i>	35
<i>1.5 Diagnóstico da malária</i>	36
1.5.1 Diagnóstico por microscopia usando esfregaços de sangue periférico	37
1.5.2 Diagnóstico usando microscópio de fluorescência	38
1.5.3 Testes sorológicos	39
1.5.4 Reação de polimerase em cadeia (PCR) e LAMP (“Loop-Mediated Isothermal”).....	40
1.5.5 Microarranjos, Citometria de fluxo, contadores automáticos de células do sangue e espectrometria de massa	41
1.5.6 Testes de diagnóstico rápido (TDR)	43
<i>1.6 Integrantes necessários para o desenvolvimento de um kit para diagnóstico rápido da malária</i>	44
1.6.1 A Técnica de imunocromatografia.....	44
1.6.2 “Proteína 2 rica em histidina” (HRP2).....	48
1.6.3 Produção de anticorpos monoclonais	51
<i>1.7 Retrospectiva dos projetos antecedentes</i>	52
<i>1.8 Perspectivas da utilização do teste para diagnóstico rápido para malária nacional</i>	54

2 - OBJETIVOS

2.1 Geral.....	58
2.2 Específicos	58

3 – METODOLOGIA

3.1 Plasmídeo pGEX-HRP2.....	60
3.2 Expressão protéica e SDS-PAGE	61
3.3 Lise celular e purificação das proteínas recombinantes	61
3.4 ELISAS.....	62
3.5 Imunização de camundongos Balb/C	64
3.6 Descongelamento, cultura e congelamento de hibridomas produtores de anticorpos anti-GST e mielomas	65
3.7 Obtenção de células peritoneais de camundongo	66
3.8 Produção de anticorpos monoclonais.....	66
3.9 Imunofluorescência indireta utilizando monoclonal anti-HRP2 e hemácias parasitadas com cultura de <i>P. falciparum</i>	69
3.10 Purificação de anticorpos monoclonais.....	70
3.11 Acoplamento dos anticorpos ao ouro coloidal e montagem do sistema em fluxo lateral (Lateral flow).....	71
3.12 Teste para padronização do sistema em fluxo lateral competitivo utilizando anticorpos monoclonais anti-GST.....	72
3.13 Padronização do sistema em fluxo lateral em formato sanduíche utilizando anticorpos policlonais de camundongo anti-rHRP2-GST e anticorpo monoclonal anti-HRP2.....	74
3.13 Testes de estabilidade do ouro coloidal e fita imunocromatográfica.....	77

4 – RESULTADOS

4.1 Expressão e Purificação da proteína recombinante rHRP2	79
4.2 ELISA com soro dos animais imunizados com rHRP2-GST	81
4.3 ELISA dos sobrenadantes de cultura de hibridomas anti-HRP2....	84
4.4 Imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti-HRP2	91
4.5 Purificação de anticorpos monoclonais anti-GST para padronização do sistema em fluxo lateral.....	92
4.6 Teste do sistema em fluxo lateral competitivo com Mab-GST.....	94

<i>4.7 Teste do sistema em fluxo lateral em formato sanduíche com policlonal de camundongo anti-rHRP2-GST e anticorpo monoclonal anti-HRP2.....</i>	<i>97</i>
<i>4.8 Determinação da estabilidade do ouro coloidal e fita imunocromatográfica</i>	<i>99</i>
5 – DISCUSSÃO.....	100
6 – CONCLUSÃO	109
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8 – ANEXOS.....	122

1 - Introdução

1.1 Breve Histórico sobre a Malária

Relatos sobre febres intermitentes podem ser encontradas em diversas culturas antigas. Na China, há manuscritos de Nei Ching a 4.700 anos atrás que aparentemente relata febres repetidas associadas ao aumento do baço e uma tendência para ocorrência epidêmica. Escrituras similares foram encontradas na Índia (3.500 a 2.800 anos atrás), em textos Sumérios e Egípcios (3.500 a 4.000 anos atrás), e na Mesopotâmia (323 anos d.c.) na rota para Índia, onde Alexandre “O Grande” parece ter morrido por malária (CARTER & MENDIS, 2002).

No século V a.C., na Grécia, Hipócrates foi o primeiro médico a descrever detalhadamente um quadro que apresentava sintomas de ocorrência sazonal e febres intermitentes (BRUCE-CHWAIT, 1985), não deixando dúvida da presença da malária na Grécia nas formas terçã benigna (*P. vivax*), quartã (*P. malariae*) e sub-terçã maligna (*P. falciparum*) (CARTER & MENDIS, 2002). Esta doença parece não ter atingido a Itália até o século dois a.C. Durante o período de prosperidade do Império Romano (de 50 a.C. a 400 d.C), devido aos grandes projetos arquitetônicos lá desenvolvidos (o que afastou a população das regiões pantanosas), não houve relatos desta enfermidade por vários séculos nestes locais. Porém, com a queda do Império a Roma medieval tornou-se novamente cercada pelos perigosos e inabitados pântanos conhecidos e temidos por várias gerações. Essas febres intermitentes receberam o nome de malária, em decorrência da associação entre a doença e os miasmas provenientes de áreas alagadas que tinha “mau ares”, no italiano “mal’aria”, pois acreditava-se que a doença era transmitida através do ar (BRUCE-CHWAIT, 1985).

De fato, a causa das febres periódicas sazonais foi uma contínua fonte de debate até o fim do século dezenove. Em 1879, Edwin Klebs e Corrado Tommasi-Crudelli relataram a identificação de uma bactéria causadora da Malária. A obtenção do “organismo”, *Bacillus malariae*, de pacientes com malária foi confirmada por fisiologistas e patologistas italianos influentes na época – e relatos similares começaram a aparecer

nos EUA (Estados Unidos da América). Em outubro de 1880, Charles Louis Alphonse Laveran estava examinando o sangue fresco de um paciente com febre e observou corpos móveis, os quais ele supôs corretamente serem parasitas de células do sangue. A primeira espécie parasitária da malária humana foi identificada por Laveran em 1881 denominando-a como *Plasmodium malariae*. A transmissibilidade do sangue infectado foi provada 4 anos depois por Gerhardt, mas a rota da infecção natural não seria descoberta até a próxima década (COOK, 1996).

Em 1894, Patrick Manson ao estudar a transmissão de *Wucheria bancrofti* por mosquitos, levantou a hipótese de que os mesmos poderiam ser transmissores da malária. Em 1897, Ronald Ross conseguiu provar que os mosquitos *Culex* transmitiam a malária aviária e demonstrou o ciclo de vida completo do parasito utilizando como modelo. Relatou ainda a presença de corpos pigmentados no intestino de certas espécies de mosquitos alimentados com o sangue de pacientes com malária, chegando à conclusão de que a malária humana poderia ser transmitida da mesma forma que a aviária (COOK, 1996). Baseados nesses conhecimentos, os malariologistas italianos Giovanni Battista, Amico Bignami e Giuseppe Bastianelli concluíram suas pesquisas sobre a malária, descobrindo, em 1899, o desenvolvimento completo das três espécies de plasmódios humano em mosquitos do gênero *Anopheles* (DOBSON, 1999).

1.2 Epidemiologia da malária no mundo

A malária (ou paludismo, maleita, sezão) é uma das principais causas de morbi-mortalidade em todo o mundo. Esta afeta um grande número de países, sendo relatado que os índices da doença em 2008 foram em torno de 243 milhões de casos. Mais de dois bilhões de pessoas, representando mais de 40% da população mundial, vivem em risco de contrair malária, e o número de mortes causadas pela doença pelo mundo está estimada em 863 000 por ano. No final do ano de 2006,

109 territórios do mundo apresentavam transmissão de malária (Figura 1) (WHO reports, 2008).

A faixa endêmica de malária fica próxima a linha do Equador, na América do Norte e Sul, Sul e Sudeste Asiático, e em quase toda a África (Figura 1); entretanto, é na região sub-Saariana onde 85–90% das fatalidades por malária ocorrem. A distribuição geográfica da malária dentro das grandes regiões é complexa, e áreas livres e não-livres de malária são freqüentemente encontradas próximas uma das outras (GREENWOOD *et al.*, 2002). Em áreas secas, surtos de malária podem ser preditas com razoável precisão pelo mapeamento das chuvas (GROVER-KOPEC *et al.*, 2005).

Através dos tempos e até os dias de hoje, a malária tem sido um dos mais importantes impedimentos para o desenvolvimento social e econômico de uma região. Ela sozinha tem sido suficiente para enfraquecer esforços no pioneirismo, agricultura e construção civil. Historicamente, empreendimentos econômicos foram dificultados ou impossibilitados com a presença da malária (CARTER & MENDIS, 2002). Um exemplo foi a construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré, em Porto Velho (Rondônia), durante a qual, entre 1872 e 1912, vários empregados sofreram com a malária e outras doenças (PREFEITURA DE PORTO VELHO, 2010).

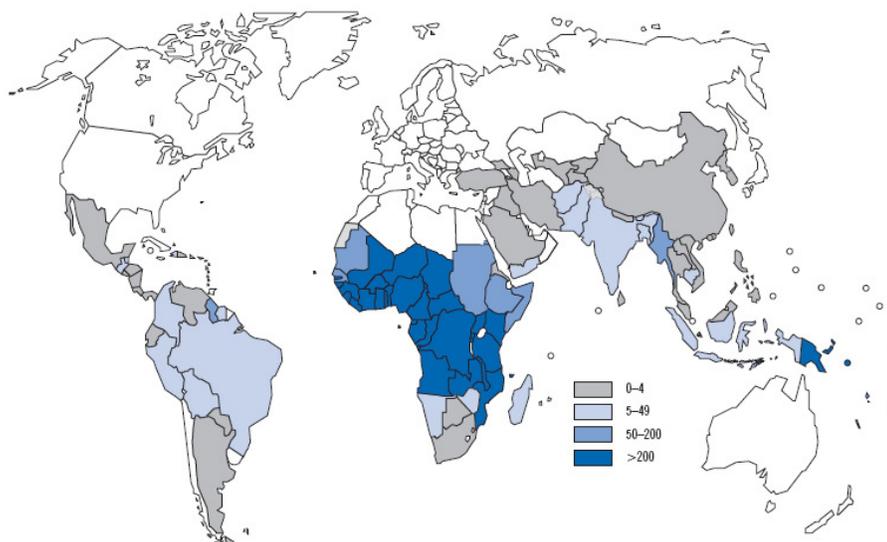


Figura 1 – Número estimado de casos de malária causada por qualquer espécie por 1000 habitantes no ano 2006. FONTE: WHO reports 2008.

O paludismo enfraquece significativamente o desenvolvimento econômico em áreas com alto índice de transmissão, havendo uma diminuição de aproximadamente 1,3% no crescimento econômico anual nestes países. Isto ao longo dos anos leva a diferenças substanciais no Produto Interno Bruto (PIB) destes países, quando comparados a países sem a ocorrência da doença (*OLIVEIRA, 2009*).

Pelas razões expostas acima, a malária é uma doença altamente complexa e as pesquisas visando sua prevenção ou tratamento são provavelmente mais diversas do que qualquer outra (*WHITTY, 2002*).

1.3 Malária no Brasil

A malária acometia cerca de seis milhões de brasileiros por ano na década de 40, em todas as regiões. As mudanças sociais ocorridas e o intenso trabalho de controle desenvolvido por meio da Campanha de Erradicação da Malária (CEM) possibilitaram um relativo controle da doença, que passou a apresentar uma incidência de menos de 100 mil casos anuais e restringindo-se espacialmente, em áreas de proximidade da floresta, na Amazônia Legal.

Durante um período da década de 70 e 80, houve a criação da SUCAM e a execução de projetos de desenvolvimento da Amazônia, como abertura de estradas, construções de hidroelétricas, expansão de áreas de garimpo, entre outros promoveram uma grande migração interna no País, com alterações ambientais importantes e exposição de um grande contingente populacional em áreas malarígenas. Essa situação provocou aumento significativo do número de casos da malária (gráfico 1), passando a alcançar níveis anuais de aproximadamente 600 casos por 1000 habitantes (*BRASIL, 2010a*).

Devido à alta incidência, a malária se tornou um grave problema de saúde pública e seus efeitos debilitantes sobre as pessoas acometidas

contribuíram negativamente para o desenvolvimento socioeconômico destas regiões. Logo, o governo federal tentou implantar alguns planos de controle da malária na região, porém com insucesso, como a estratificação epidemiológica da SUCAM, a operação impacto, o PCMAM (projeto de controle da malária na bacia amazônica), PCIM (programa de controle integrado da Malária), Plano de intensificação das ações de controle da malária nas áreas de alto risco da Amazônia legal, até que em 1999 (quando se registrou mais de 637 mil casos) foi criado, sob uma pressão internacional, o PIACM que prometia a redução de 50% por cento dos casos de malária e de mortalidade causada pela doença, cujo foco foi o diagnóstico e tratamento precoce dos casos de malária. Este ficou em vigor até 2003, atingindo bons resultados.

Em parceria com estados e municípios, as ações de controle da malária na Amazônia alcançaram resultados positivos, levando a uma redução de 50,2% na incidência da malária na Região da Amazônia Legal, ao final do ano de 2002 (15,9 casos de malária por mil habitantes) (Gráfico 1). Comparando-se os dados de 1999 quando se registrava 31,9 casos de malária por mil habitantes, o número absoluto de casos reduziu de 637 mil casos para 349 mil casos em 2002. Visando melhorar o fluxo, a qualidade e a oportunidade de informações entre os municípios, estados e em nível nacional, a secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), antiga FNS, implantou, no ano de 2003, o Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (SIVEP -Malária) na Região Amazônica (BRASIL, 2010b).

Após a intensificação destas ações, o número de municípios considerados de alto risco de transmissão de malária passou de 160 para 72 municípios. As internações reduziram 69,2%, e o número de óbitos por malária diminuiu 54,7%. Além da melhoria destes indicadores, cabe ressaltar outros avanços obtidos, como a capacitação de profissionais de saúde, a inserção das atividades de controle da malária nos sistemas locais de saúde, principalmente na atenção básica, a expansão da rede de diagnóstico e tratamento, propiciando um diagnóstico rápido e tratamento oportuno, composição de equipes de vigilância

epidemiológica em alguns municípios e o controle seletivo de vetores (BRASIL, 2010a).

O PIACM foi substituído pelo PNCM, que estabeleceu uma política permanente para prevenção e controle da endemia, continuando os avanços alcançados pelo PIACM e agregando atividades adicionais recomendadas na sua avaliação. Todavia, a malária voltou a apresentar aumento na incidência nas áreas endêmicas dos estados da Amazônia. Entre 2002 e 2003 foi observado um aumento na incidência de 17,9% devido, principalmente, à ocupação desordenada e intensa na periferia de cidades como Manaus (AM), Porto Velho (RO) e Cruzeiro do Sul (AC), que concentraram no período um quarto dos casos da região, além de outros fatores como o desmatamento de novas áreas e o aumento do número de criadouros de vetor, devido à crescente atividade econômica de piscicultura em várias cidades.

Em 2008, o número de casos de malária no Brasil foi de 315 631, chegando a um total de 410.475 casos no ano passado (anexo 1). Apesar dos esforços do PNCM, a elevada incidência da malária está associada a fatores ambientais que favorecem a instalação dos vetores anofelinos e características socioeconômicas da população habitantes nas áreas de risco. Vários estados, tais como o Amazonas, Pará, Rondônia, pertencentes a Amazônia Legal possuem estas características ambientais e sofreram um intenso fluxo migratório nos últimos 30 anos favorecendo para o aumento de casos de malária (Figura 2). Juntando-se os casos de malária nestes três estados, mais aqueles que ocorrem no Acre, Amapá, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão perfazem um total de 99,5% dos casos de malária no Brasil, atualmente.

Nos estados mencionados, a maior parte dos casos de malária é devida ao *P. vivax*, no entanto, há um incremento do percentual de casos de malária por *P. falciparum*, em razão do fluxo migratório que não pára de acontecer nestas regiões e que desestabilizam o controle de malária no local. Neste contexto, os casos de malária por *P. falciparum* são preocupantes, pois ele é responsável pela ocorrência das formas mais

graves da doença e dos óbitos decorrentes destas complicações (PORTAL DA SAÚDE, 2007).

A SVS vem mantendo a política permanente do PNCM, que se caracteriza pela descentralização de atendimento dos doentes (realizado pelos municípios) e assegurando a sustentabilidade das ações de epidemiologia e controle da doença para estados e municípios. Contudo, diante do exposto acima, é necessário o permanente aperfeiçoamento como a introdução de diagnóstico rápido nas ações epidemiológicas e no atendimento do paciente para que alcancem os avanços no controle da malária.

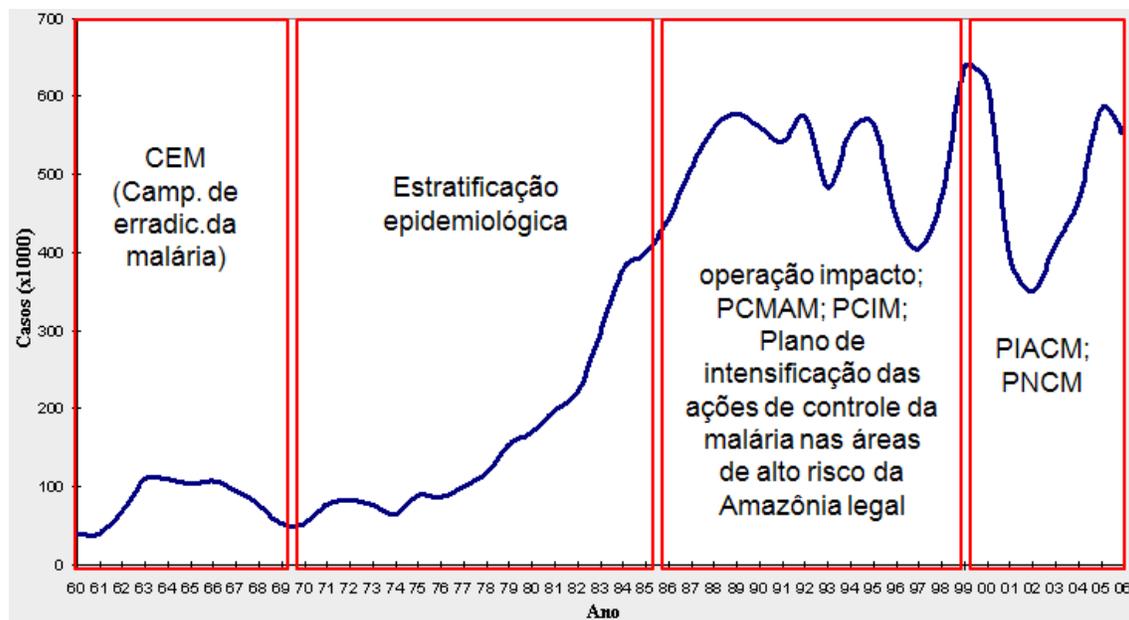


Gráfico 1 – Casos de malária no Brasil entre os anos de 1960 e 2006 relacionados com as campanhas de combate a doença. FONTE: alterado de BARATA, 2006.

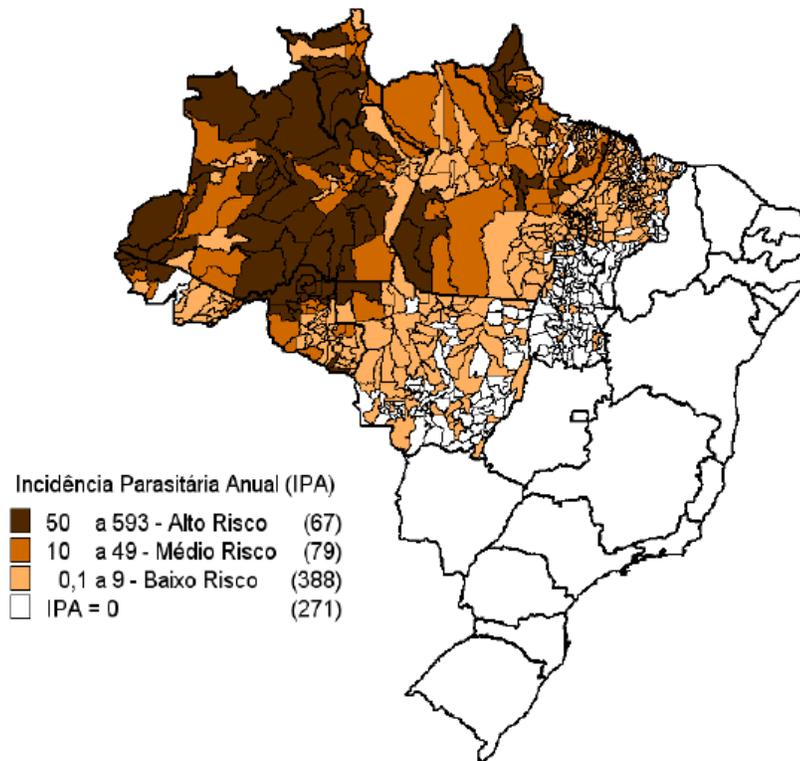


Figura 2 - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual (a informação entre parênteses representam o número de municípios afetados). FONTE: BRASIL, 2009.

1.4 Ciclo de vida e aspectos clínicos

Os parasitos da malária são classificados como protozoários pertencentes ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, subclasse *Coccidia*, ordem *Eucocidiida*, subordem *Haemosporina*, família *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium*. Mais de 100 espécies de *Plasmodium* podem infectar inúmeras espécies de animais, tais como reptéis, aves e vários mamíferos, mas apenas quatro espécies podem infectar o ser humano sob condições naturais: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. malariae* (RENU TUTEJA, 2007).

O vetor da doença é o mosquito do gênero *Anopheles*. De aproximadamente 400 espécies de anofelinos existentes no mundo, cerca de 60 são vetores da malária sob condições naturais, e 30 destes são de

maior importância (RENU TUTEJA, 2007). Ocupando grande parte do continente sul-Americano, *Anopheles darlingi* é considerado o vetor primário da malária, sendo encontrado principalmente na Região Amazônica. Outras espécies de anofelinos são consideradas vetores secundários da doença, como aqueles pertencentes ao complexo *Albitarsis*, composto, provavelmente, por quatro espécies: *Anopheles albitarsis s.s.*, uma espécie “B” ainda não nomeada, *Anopheles marajoara* e *Anopheles deaneorum* (LIMA & CARNEIRO, 2005).

As fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles* são os hospedeiros definitivos, pois é dentro do mosquito que ocorre a fecundação dos estágios sexuais do *Plasmodium* (Figura 3). O homem é considerado hospedeiro intermediário, embora durante o ciclo do parasita as formas sexuais se desenvolvam (TALMAN *et al.*, 2004). As fêmeas dos mosquitos *Anopheles* infectadas carregam os esporozoítos do *Plasmodium* em suas glândulas salivares. Os esporozoítos presentes na saliva do mosquito são injetados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, durante o repasto. Num período de 15 a 45 minutos, os esporozoítos migram até o fígado e invadem os hepatócitos. Os mecanismos de localização e invasão dos hepatócitos não são bem compreendidos ainda, mas estudos têm mostrado que a migração de esporozoítos através de vários hepatócitos em células de mamíferos é essencial para completar seu ciclo de vida (MOTA *et al.*, 2001). Nessas células, eles sofrem alterações morfológicas e se diferenciam em esquizontes teciduais. O tempo para completar a fase tecidual varia, dependendo da espécie infectante; (8–25 dias para *P. falciparum*, 8–27 dias para *P. vivax*, 9–17 dias para *P. ovale* e 15–30 dias para *P. malariae*) (RENU TUTEJA, 2007). A grande produção de esquizontes teciduais maduros estimula o rompimento dos hepatócitos, liberando os merozoítos que alcançam a circulação periférica finalizando a esquizogonia exo-eritrocítica. Dentre as 4 espécies que infectam o homem, alguns esporozoítos do *P. vivax* e *P. ovale*, conhecidos como hipnozoítos, podem permanecer em estado de latência por meses ou até anos e num dado momento, e sem causas conhecidas, sofrem um processo

de ativação da esquizogonia exoeritrocítica e iniciam um novo ciclo eritrocítico sintomático provocando as recaídas de malária.

A entrada do merozoíto no eritrócito ocorre por um complexo processo de invasão, o qual pode ser dividido em quatro fases: (a) reconhecimento inicial e adesão reversível do merozoíto à membrana do eritrócito; (b) reorientação e formação de juntas entre a terminação apical do merozoíto (adesão irreversível) e liberação de substâncias das organelas “rhoptria” e micronemas, levando a formação do vacúolo parasitóforo; (c) movimentos das junções e invaginação da membrana da hemácia ao redor do merozoíto acompanhada pela remoção da capa superficial de proteína do merozoíto; e (d) separação do vacúolo parasitóforo e membrana do eritrócito completam a invasão do merozoíto (MILLER *et al.*, 2002).

Após a invasão dos eritrócitos, ocorre uma diferenciação dos merozoítos em corpos amebóides, denominados trofozoítos. O crescimento destes é acompanhado por um metabolismo altamente ativo, o qual inclui a glicólise de grandes quantidades de glicose importada, a ingestão do citoplasma do hospedeiro e a proteólise da hemoglobina em aminoácidos constituintes. O parasita da malária não pode degradar a porção heme da hemoglobina, sendo esta potencialmente tóxica para o parasita. Logo, durante a degradação da hemoglobina, grande parte da porção heme liberada é polimerizada em hemozoína (pigmento da malária), uma substância cristalina que é estocada dentro do vacúolo digestivo. O final do estágio de trofozoíto é marcado por múltiplas divisões nucleares sem citocinese, resultando na formação dos esquizontes. Cada esquizonte maduro contém cerca de 20 merozoítos e estes são liberados após o rompimento da hemácia sendo capazes de infectar novos eritrócitos, reiniciando o ciclo (RENU TUTEJA, 2007). Esse rompimento coincide com o aumento da temperatura do corpo durante o progresso da doença. Febres “benignas terçã” são assim chamadas devido elas não estarem associadas com a manifestação grave e freqüentemente fatal das febres periódicas “subterçã, maligna” (*P. falciparum*). Os termos “Terçã” e “quartã” estão relacionados às

características de episódios de febre aguda, que se repete respectivamente a cada três (*P. vivax*) ou quatro (*P. malariae*) dias (CARTER & MENDIS, 2002). Parte dos parasitas se diferenciam em macro e microgametócitos, que são transmitidos para os hospedeiros invertebrados durante um novo repasto (Gilles *et al.*, 1993). Esses gametócitos são essenciais para transmissão da infecção para novos hospedeiros invertebrados. Normalmente, um número variado de ciclos assexuais de esquizogonia eritrocítica ocorre antes de qualquer gametócito ser produzido. No *P. falciparum*, a gametocitogênese leva de 10 à 12 dias. Já nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* leva cinco dias e *P. malariae* de 5 à 23 dias.

Durante o repasto sanguíneo em indivíduos contaminados, as fêmeas dos mosquitos *Anopheles* podem ingerir gametócitos. Estes caem no aparelho digestivo do mosquito, onde macrogametócitos formam macrogametas e a flagelação do microgametócito produz os microgametas. Estes gametas se juntam, entrando em fertilização e formando um zigoto. Este se transforma em um oocineto, o qual penetra na parede da célula do aparelho digestivo e se torna um oocisto. A esporogonia dentro do oocisto produz diversos esporozoítos e quando o oocisto se rompe, eles migram para as glândulas salivares do mosquito, podendo assim o ciclo de vida do parasita ser reiniciado. Esta reprodução dentro do mosquito leva de 10 à 18 dias e o mosquito permanece infectado de 1 à 2 meses.

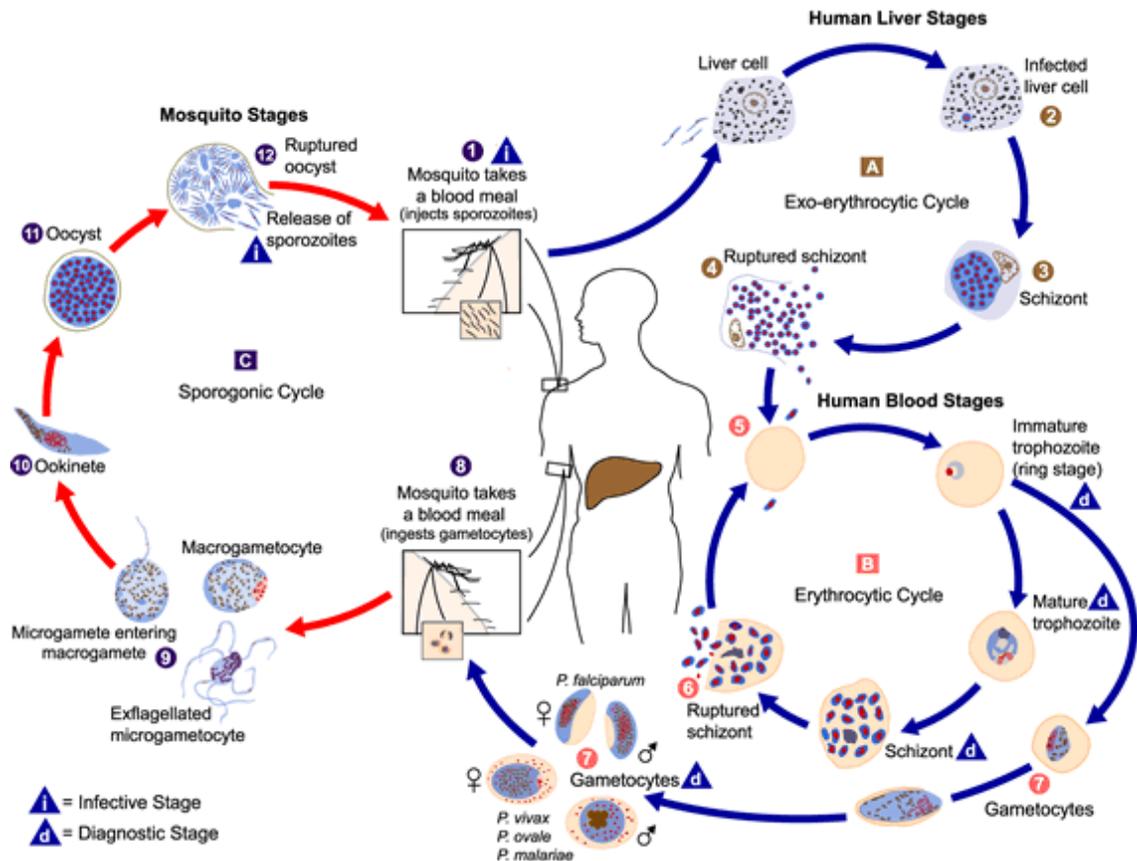


Figura 3 – Ciclo de vida do parasita da malária em humanos. FONTE: CDC, 2010.

Os sintomas da malária podem aparecer de 7 à 14 dias após a picada do mosquito infectado, ou até meses seguintes após a saída de uma área em que a doença esteja presente. A crise aguda da malária caracteriza-se por episódios de calafrios, febre e sudorese. Têm duração variável de 6 a 12 horas e pode cursar com temperatura igual ou superior a 40°C. Em geral, esses paroxismos são acompanhados por cefaléia, mialgia, náuseas e vômitos. Após os primeiros paroxismos, a febre pode passar a ser intermitente.

O diagnóstico precoce e o tratamento correto e oportuno são os meios mais adequados para reduzir a gravidade e a letalidade por malária (BRASIL, 2009).

1.4.1 Agravamentos em infecções causadas por *P. falciparum*

A mortalidade da malária na década recente tem ocorrido devido quase que exclusivamente pelo *Plasmodium falciparum* (CARTER & MENDIS, 2002). As complicações decorrentes da malária são complexas e vários processos patogênicos, tais como a hipoglicemia, insuficiência renal e pulmonar, coma e anemia grave, podem se combinar e causar uma doença séria e freqüentemente fatal (RENU TUTEJA, 2007).

A adesividade dos eritrócitos infectados por *P. falciparum* por receptores nas células endoteliais provoca o seqüestro destes eritrócitos na microcirculação de órgãos vitais (por exemplo, cérebro, pulmão e rins, placenta), interferindo com o transito microcirculatório e com o metabolismo anaeróbico do tecido do hospedeiro (COOK, 1996). Esta adesividade está relacionada com a interação do receptor PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1*), produzido pelo parasita durante o estágio de trofozoíto, à receptores do hospedeiro tais como CD36, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e CSA (*chondroitin sulfate A*) (FAIRHURST & WELLENS, 2006).

Outra manifestação grave que ocorre tanto em adultos quanto em crianças com malária é a anemia, contudo, as crianças têm uma maior tendência a desenvolver anemia grave e convulsões (MISHRA, 2006). Elas podem apresentar prostração ou inabilidade a tomar fluidos orais, ou, em crianças mais jovens, inabilidade de sugar.

Com o progresso da doença além da anemia eles podem exibir um número de síndrome(s) grave(s) incluindo insuficiência respiratória e hipoglicemia, podem ter uma alta taxa de bacteremia e coma (CASALS-PASCUAL *et al.*, 2002).

Entre adultos, a malária grave se caracteriza comumente por falha aguda do sistema renal e aparência amarelada da pele. Mulheres grávidas são vulneráveis à hipoglicemia, anemia e complicações pulmonares. A taxa de mortalidade na malária grave fica em torno de 10-15% dos casos com tratamento, porém este número pode aumentar na presença de falha no sistema renal ou no sistema respiratório (edema pulmonar ou

síndrome respiratória aguda grave). Além disto, falha múltipla dos órgãos e quadros de alta mortalidade vem sendo descritos constantemente em diferentes partes da Índia (MISHRA *et al.*, 2006).

Concluindo, a Tabela 1 resume as características clínicas e laboratoriais da malária grave.

Sintomas e sinais	Prostração Alteração da consciência Dispnéia ou hiperventilação Convulsões Hipotensão arterial ou choque Edema pulmonar ao Rx de tórax Hemorragias Icterícia Hemoglobinúria Hiperpirexia (>41°C) Oligúria
Alterações laboratoriais	Anemia grave Hipoglicemia Acidose metabólica Insuficiência renal Hiperlactatemia Hiperparasitemia

Tabela 1 – Manifestações clínicas e laboratoriais da malária grave e complicada, causado pela infecção por *P. falciparum*. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009.

1.5 Diagnóstico da malária

O diagnóstico da malária num paciente pode ser feito com base nos sintomas durante o exame. Contudo (visto a semelhança dos sintomas da malária com outras doenças como dengue, a febre amarela, a leptospirose, a febre tifóide e muitas outras), para que um diagnóstico definitivo seja feito, testes laboratoriais devem apresentar o parasita da malária ou algum de seus componentes (BRASIL, 2008).

Existem diferentes técnicas laboratoriais para o diagnóstico da malária. As vantagens e empecilhos destes métodos, relacionados a sensibilidade, especificidade, tempo para o resultado, custo-efetividade,

intensidade de trabalho laboratorial e a necessidade de profissionais experientes são relatadas nas seções à seguir.

1.5.1 Diagnóstico por microscopia usando esfregaços de sangue periférico

Tradicionalmente, o diagnóstico confirmatório da malária é feito pelo exame microscópico do sangue, necessitando de material e reagentes adequados, bem como de técnicos bem treinados para sua realização, objetivando a detecção e diferenciação das espécies de plasmódios (BRASIL, 2009). Este tipo de diagnóstico mudou muito pouco desde a descoberta por Laveran do parasita da malária, havendo melhoramentos nas técnicas de coloração no final do século XIX por Romanowsky. Mais de um século depois, a detecção e identificação por microscopia das espécies de *Plasmodium* em esfregaços em gota espessa (para a procura da presença do parasita), e esfregaço delgado (para confirmação da espécie) continua sendo o método padrão para o diagnóstico. As colorações utilizadas para os esfregaços são a Giemsa, Wright e Field (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

Durante as primeiras ações visando a erradicação da malária, a microscopia foi o principal método de diagnóstico. Apesar dos desafios organizacionais e logísticos, inúmeros países localizados em áreas malarígenas conseguiram com sucesso eliminar a doença. Entretanto muitos países do sudeste da Ásia e das Américas não obtiveram sucesso mesmo criando e mantendo o serviço de diagnóstico (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007)

A microscopia possui numerosas limitações:

- O procedimento necessita de trabalho laboratorial intenso e de tempo para o resultado;
- Variações nas colorações e na técnica usada para coletar e processar o sangue afeta a interpretação da lâmina;

- A precisão do diagnóstico é uma habilidade que requer muito treinamento e experiência, tanto em países onde a malária é endêmica quanto onde ela é importada;
- Microscópios clínicos de rotina não detectam com segurança parasitemias muito baixas ou parasitas seqüestrados;
- E até mesmo quando o exame é solicitado, clínicos podem decidir não esperar pelo resultado ou não ter confiança no teste e tratar o paciente apesar de um resultado negativo na microscopia.

Esses problemas aumentam em áreas onde a malária não é endêmica, onde buscas por microscopia para o parasita da malária não são freqüentes. Além disso, exames pós-tratamento de esfregaços podem resultar em observação de inúmeros parasitas circulantes. Estes, porém, podem estar mortos e ainda não foram eliminados do corpo, assim o resultado é tido como positivo para a doença e o tratamento do paciente é estendido (MOODY, 2002)

1.5.2 Diagnóstico usando microscópio de fluorescência

No intuito de acelerar a detecção dos parasitas da malária no esfregaço, métodos alternativos vêm sendo introduzidos. Certos corantes fluorescentes têm uma afinidade a ácidos nucleicos no núcleo do parasita e se ligam a estes. Quando excitados por luz ultravioleta, em um comprimento de onda apropriado, o núcleo irá fluorescer fortemente. Dois fluorocromos têm sido usados freqüentemente para isto, “Acridine Orange” (AO) e “benzothiocarboxypurine” (BCP), ambos excitados a 490 nm e exibindo fluorescências verde maçã e amarelo (MOODY, 2002). Na técnica QBC (“Quantitative buffer coat”), o sangue periférico retirado do paciente é coletado em um tubo contendo AO e anticoagulante. Esse tubo é centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos e imediatamente examinado no microscópio de fluorescência (CHOTIVANICH *et al.*, 2006). Esta técnica

tem se mostrado rápida e sensível para diagnóstico da malária em inúmeros laboratórios, porém, apesar de ser simples, confiável e segura, ela precisa de instrumentos especiais, é mais onerosa que a microscopia de luz, e é pobre na determinação de espécie e número de parasitas da malária (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

1.5.3 Testes sorológicos

O diagnóstico da malária usando métodos sorológicos é normalmente baseado na detecção de anticorpos contra a fase assexuada eritrocítica da malária. O teste de imunofluorescência usando anticorpos (IFA, do inglês “Immunofluorescence antibody testing”) tem sido um teste sorológico confiável para malária nas últimas décadas (SHE *et al.*, 2007). Apesar do tempo gasto para execução da técnica e sua subjetividade, ela é altamente sensível e específica. Outras desvantagens são que ela não pode ser automatizada (o que limita o número de exames diários), ela necessita de um microscópio de fluorescência e técnicos bem treinados, principalmente casos com baixo nível de anticorpos (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

1.5.4 Reação de polimerase em cadeia (PCR) e LAMP (“Loop-Mediated Isothermal”)

Com o desenvolvimento da tecnologia de amplificação do DNA dos plasmódios usando a reação de polimerase em cadeia (PCR), o diagnóstico da malária baseado na detecção de ácido nucléico (gene do RNA ribossomal 18S) mostrou grande progresso em termos de eficácia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Esta técnica tem provado ser a mais específica (pode detectar todas as espécies de *Plasmodium* se associada a

técnica de “nested” e “multiplex” [MOODY, 2002]) e sensível principalmente em casos de baixa parasitemia ou infecções mistas (PCR pode detectar de 1 a 5 parasitas/ μ L de sangue) (TANGPUKDEE *et al.*, 2009). Estas características fazem esta técnica ideal para procedimento de diagnóstico da malária (MOODY, 2002).

Apesar da PCR transpor os dois maiores problemas do diagnóstico da malária, sensibilidade e especificidade, a utilização do método é limitada pela complexidade metodológica, alto custo, e a necessidade de técnicos treinados. Controle de qualidade e manutenção de equipamento são também essenciais para a PCR, logo isto faz dela desapropriada para áreas rurais remotas ou até mesmo para clínicas de diagnóstico de rotina (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

A técnica LAMP é aclamada por ser um teste molecular simples e barato para o diagnóstico da malária detectando o gene do RNA 18S do ribossomo de *P. falciparum* (PARIS *et al.*, 2007). Outros estudos têm mostrado sensibilidade para as outras espécies causadoras da malária no homem. Esta se caracteriza por usar 4 iniciadores diferentes especialmente desenhadas para reconhecer 6 regiões distintas no gene alvo e o processo de reação ocorre a uma temperatura constante usando reações de fitas deslocadas. Amplificação e detecção do gene pode ser completada em um único passo, através da incubação da mistura de amostras, iniciadores, DNA polimerase com atividade de deslocamento e substrato, numa temperatura constante (cerca de 65 °C). Isto propicia uma alta eficiência de amplificação, com DNA sendo amplificado 10^9 - 10^{10} vezes em 15-60 minutos. Devido a esta alta especificidade, a presença de produtos amplificados pode indicar a presença do gene alvo (EIKEN GENOME SITE, 2010).

LAMP é apresentada como sendo mais fácil, sensível, rápida e de mais baixo custo que a PCR, porém, seus reagentes precisam ser estocados no frio, e mais testes clínicos são necessários para confirmar a possibilidade da utilização deste teste em campo (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

1.5.5 Microarranjos, Citometria de fluxo, contadores automáticos de células do sangue e espectrometria de massa

Microarranjos podem ter um papel importante no futuro do diagnóstico de doenças infecciosas. O princípio da técnica de microarranjos se assemelha a tradicional hibridização de Edward M. Southern. O ideal é que essa técnica possa ser “minituarizada” e automatizada para testes laboratoriais remotos (“point-of-care”). Um oligonucleotídeo de microarranjo pan-microbiano tem sido utilizado para o diagnóstico de doenças infecciosas e identificou o *P. falciparum* com precisão. Essa técnica de diagnóstico, porém permanece em seu estágio inicial de desenvolvimento (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

A citometria de fluxo tem sido usada com certa frequência para o diagnóstico da malária. Resumidamente, o princípio da técnica está baseada na detecção da hemozoína. Esse método pode ter uma sensibilidade de 49-98% e uma especificidade de 82-97% no diagnóstico da doença. Existem inúmeras desvantagens em utilizar este método, como por exemplo, exigir muito trabalho laboratorial, precisar de técnicos treinados, o custo do equipamento, e a possibilidade de ocorrer falso-positivos com bactérias ou infecções virais (SHAPIRO & MANDY, 2007; BARKAN *et al.*, 2000; TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

Os contadores automáticos de células do sangue são uma ferramenta prática para o diagnóstico da malária, havendo três métodos relatados. O primeiro é usando um aparato “Cell-Dyn[®] 3500” para detectar a hemozoína em monócitos, que tem mostrado 95% de sensibilidade e 88% de especificidade. O segundo método também usa o aparato “Cell-Dyn[®] 3500” e um laser depolarizado para detectar a infecção malárica, com uma sensibilidade total de 72% e especificidade de 96%. A terceira técnica usa um “Beckman Coulter ACC” para detectar aumentos em monócitos ativados pelo volume, condutividade, dentre

outros, possuindo 98% de sensibilidade e 94% de especificidade. Apesar de promissora, nenhuma das 3 técnicas está disponível para rotina em laboratórios clínicos (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

Um novo método para detecção *in vitro* de parasitas da malária, com uma sensibilidade de 10 parasitas/ μ L, foi apresentado recentemente. Trata-se de um protocolo para limpar toda amostra sanguínea e submetê-la a uma espectrometria de massa (“direct ultraviolet laser desorption mass spectrometry”, LDMS). O biomarcador identificado neste teste é mais uma vez a hemozoína. Esta técnica é rápida e automática, e se comparada com o método de microscopia, que necessita de um microscopista experiente e que precisa de aproximadamente uma hora para chegar ao resultado, a espectrometria de massa leva de menos de 1 minuto para analisar a amostra. Contudo, áreas rurais remotas sem eletricidade são inóspitas para a existência de um espectrômetro de massa de alta tecnologia. Melhoramentos futuros nos aparelhos e na técnica podem tornar este método mais prático (TANGPUKDEE *et al.*, 2009; DUFFY & FRIED, 2005).

Contudo, até o momento, e conhecendo uma área endêmica de malária, é possível compreender que todos estes sofisticados métodos de diagnósticos são impraticáveis e inviáveis nas regiões endêmicas de malária devido algumas razões: 1) como foi mostrada anteriormente, a grande maioria dos países endêmicos é composto por países subdesenvolvidos e portanto não teriam condições para aplicar tais metodologias mesmo tornando-as mais baratas. 2) mesmo no caso do Brasil, que vem desenvolvendo vários programas de controle da malária, estas metodologias iriam requerer de infra-estrutura mais complexa aos postos de atendimento a malária espalhados por toda área rural da Amazônia Legal, além de tornar dispendiosos os gastos, o que seria indesejável para as políticas públicas em saúde.

1.5.6 Testes de diagnóstico rápido (TDR)

Diagnosticar a malária pode ficar difícil em regiões onde a malária não é endêmica, já que os clínicos do local podem desconsiderar a malária como causadoras dos sintomas do paciente, e os técnicos laboratoriais podem ter pouca experiência com o parasita, falhando assim na detecção do parasita em exames sanguíneos. Em áreas endêmicas, o diagnóstico da doença pode ser complicado no caso dos portadores assintomáticos da doença e com a falta de pessoas ou equipamentos necessários para a obtenção de um diagnóstico confiável e rápido, principalmente em locais de difícil acesso (CDC, 2007). Por esta razão, nos últimos 15 anos métodos rápidos, práticos e sensíveis vêm sendo desenvolvidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Atualmente, 86 TDR internacionais para o diagnóstico da malária estão disponíveis no mercado, produzidos por 28 fabricantes diferentes (TANGPUKDEE *et al.*, 2009). Foi estimado que em 2005 12 milhões de TDR foram produzidos mundialmente (MURRAY *et al.*, 2008). Diferente da microscopia convencional por coloração de esfregaços sanguíneos, os TDR são todos baseados no mesmo princípio, detectando o antígeno da malária em pequenas quantidades de sangue, normalmente de 5-15 μL , por um ensaio imunocromatográfico com anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno do parasita e impregnados em uma fita. O resultado, normalmente uma linha de teste colorida, é obtido em 5-20 minutos. TDR não requerem eletricidade, são simples para executar, e são fáceis de interpretar (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007). Seu limite de detecção varia de 50 – 100 parasitas/ μL (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

Os antígenos da malária atualmente usados como alvo para diagnóstico são específicos para cada espécie de *Plasmodium* ou conservados entre as espécies da afetam humanos. Anticorpos monoclonais específicos para *P. falciparum* tem sido desenvolvidos para a “proteína 2 rica em histidina” (do inglês, “histidine rich protein 2”, HRP2) e lactato desidrogenase (LDH). Para *P. vivax*, os anticorpos

monoclonais específicos foram submetidos à avaliações limitadas. Os alvos pan-específicos que vem sendo utilizados são contra as enzimas LDH e aldolase (MURRAY *et al.*, 2008).

O desempenho de TDR para o diagnóstico da malária tem sido relatado como excelente, apesar de alguns autores descreverem variação da sensibilidade do teste em áreas malarígenas. Contudo, os TDR possuem grande valor, sendo uma ferramenta para diagnóstico rápido da malária para trabalhadores do sistema público de saúde (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

1.6 Integrantes necessários para o desenvolvimento de um kit para diagnóstico rápido da malária

1.6.1 A Técnica de imunocromatografia

Desde seu desenvolvimento inicial em 1980, a tecnologia de imunoensaio em fluxo lateral tem ganhado grande aceitação (WONG & TSE, 2009). A principal razão para esta popularidade é a simplicidade do “design” do teste, visto que:

- As fitas de fluxo lateral são compactas e de fácil transporte;
- A maioria delas não precisa de reagentes externos para o resultado;
- A adição de amostras líquidas pode iniciar e completar o teste;
- Resultados são rápidos e de fácil interpretação, normalmente sem a ajuda de aparelhos
- Esta é uma poderosa tecnologia. Análises múltiplas podem ser testadas simultaneamente com uma única fita;

- Esta pode também ser facilmente combinada com outras tecnologias para dar uma análise compreensiva como, por exemplo, determinação simultânea de droga e álcool pela força policial numa situação de campo;
- A manufatura dos testes é relativamente fácil e pouco onerosa;
- Avanços na detecção de moléculas, melhora nos componentes materiais, disponibilidade de melhores equipamentos para processamento, e aumento na atenção quanto à qualidade de manufatura, tudo isto contribui para o aumento da confiança, precisão e aplicabilidade desta tecnologia.

Os ensaios para detecção de antígenos, conhecidos como testes de diagnóstico rápido (TDR), são sensíveis aos derivados do parasita da malária, tratando-se de uma alternativa rápida para o diagnóstico desta doença (CDC, 2007). Estes testes imunocromatográficos, também chamados de “lateral flow” ou “strip test”, são vendidos comercialmente há alguns anos, sendo uma extensão lógica da tecnologia usada nos testes de aglutinação em látex, o qual foi desenvolvido pela primeira vez em 1956 por Singer e Plotz.

O desenvolvimento de testes imunocromatográficos tem passado por intensas pesquisas em razão de suas propriedades, tais como fácil operação e curto tempo para análise. Os testes imunocromatográficos que usam uma membrana nua como um imunoabsorvente dão uma plataforma analítica única que permite a análise em apenas um passo, rápido e de baixo custo, além de sua longa estabilidade em diferentes condições climáticas (TECHNOTE#101, 2007).

A técnica de fluxo lateral utiliza membranas porosas (Fig. 4) que permitem o fluxo lateral da amostra de uma zona de aplicação à uma zona de reação. Na zona de aplicação (ou fase móvel) são colocadas as microesferas de ouro, ou lipossomos com corante de selênio, com

anticorpos monoclonais em sua superfície (Fig. 5a). Na zona de reação, encontramos os chamados anticorpos de captura e controle (Fig. 5a). Ao aplicarmos a amostra no sistema, os anticorpos monoclonais associados ao ouro coloidal reconhecem seu antígeno (Fig. 5b) migrando pela membrana até os anticorpos de captura (Fig. 5c), os quais reconhecem uma região do antígeno distinta dos anticorpos presentes nas microesferas, e aos anticorpos de controle, os quais reconhecem os anticorpos nas microesferas (Fig. 5c). O acúmulo das microesferas de ouro nestes sítios de reação permite a visualização do resultado a olho nu (Fig. 5c). A migração depende de várias características físicas dos componentes do “kit”, principalmente a porosidade da membrana (controlando a taxa de fluxo) e os reagentes da solução tampão usadas para transportar o complexo antígeno-anticorpo marcado na amostra de sangue lisado (MOODY, 2002; KIM & PARK, 2004).

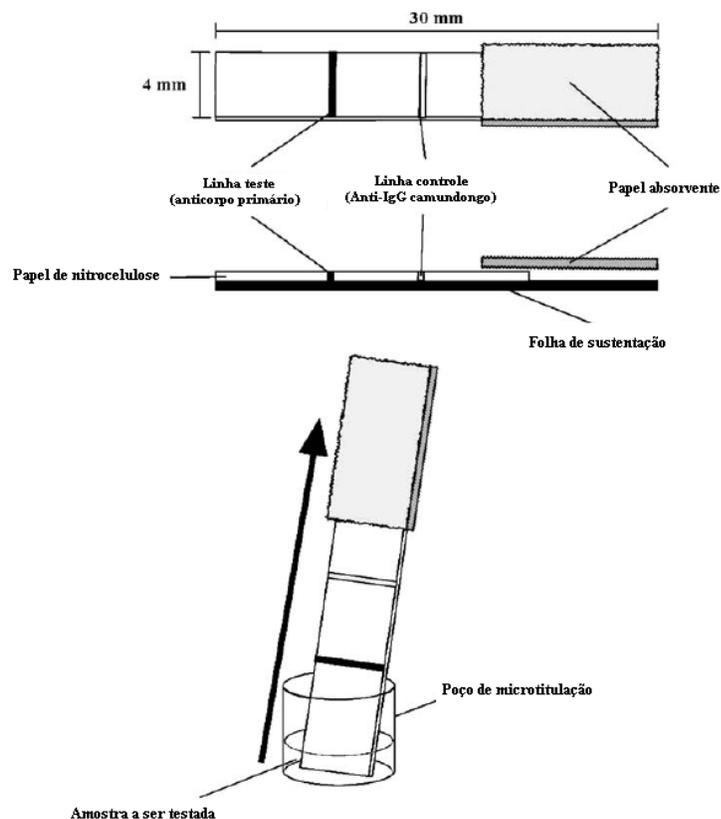


Figura 4 - Esquema de um sistema em fluxo lateral de tamanho 30x4 mm. “Papel absorvente”: membrana porosa que força o fluxo da amostra para sua extremidade; “Folha de sustentação”: Filme de poliéster que forma uma base a qual sustenta o sistema; “Membrana de nitrocelulose”: Membrana de nitrocelulose com um diâmetro de poro suficiente para a passagem das microesferas; “Linha teste”: Anticorpos de

captura da amostra (reconhecerá o antígeno); e “Linha controle”: anticorpos que reconheceram o anticorpo na microesfera; ‘Poço de microtitulação”: poço para depósito da amostra; “Amostra a ser testada”: antígeno e anticorpos conjugados a nanopartículas de ouro. FONTE: modificado de RYO TANAKA, 2006

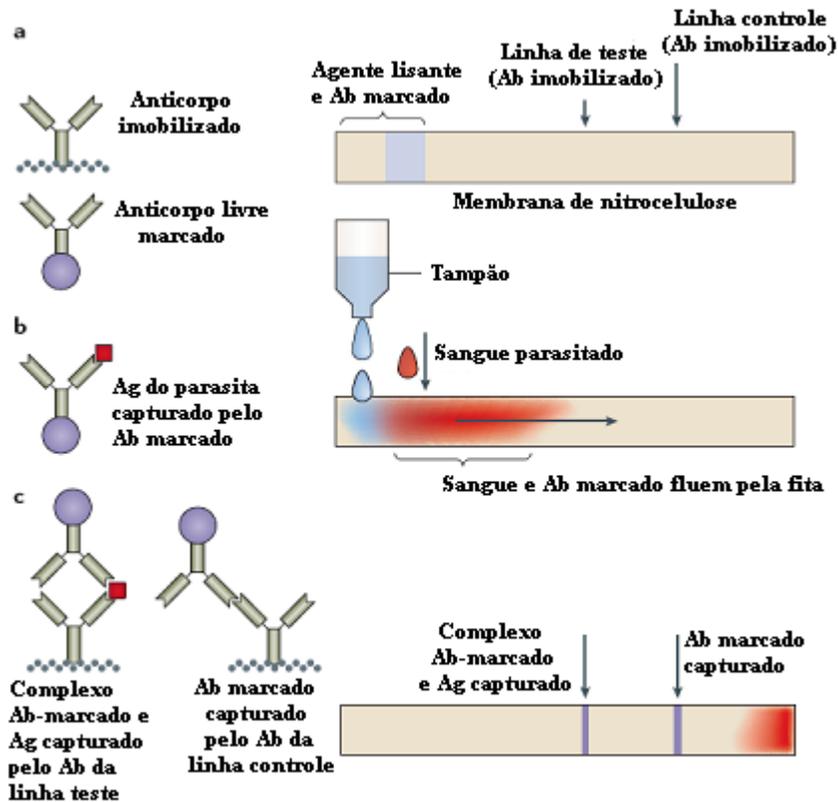


Figura 5 – Modo de ação da detecção de antígeno de um kit para diagnóstico rápido da malária. FONTE: modificado de DAVID BELL, 2006.

De maneira geral, vários formatos de sistemas em fluxo lateral têm sido descritos para diferentes aplicações além do diagnóstico da malária. Estes podem ser agrupados em dois tipos de testes: competitivos e em sanduíche. Nos primeiros há na linha de teste o antígeno imobilizado na membrana, e uma mistura de anticorpo marcado com amostra flui por capilaridade. Neste caso, a resposta do sinal formado indiretamente proporcional a quantidade de antígeno na amostra (logo quanto mais antígeno presente na amostra, mais fraco será o sinal; se não há antígeno o sinal será forte) (figura 6). No formato sanduíche há na linha de teste um anticorpo específico contra o antígeno, e fluem por capilaridade, da mesma forma que o formato anterior, os anticorpos marcados e a

amostra. Aqui a resposta do sinal formado é diretamente proporcional a quantidade do antígeno na amostra (figura 6) (POSTHUMA-TRUMPIE *et al.*, 2009).

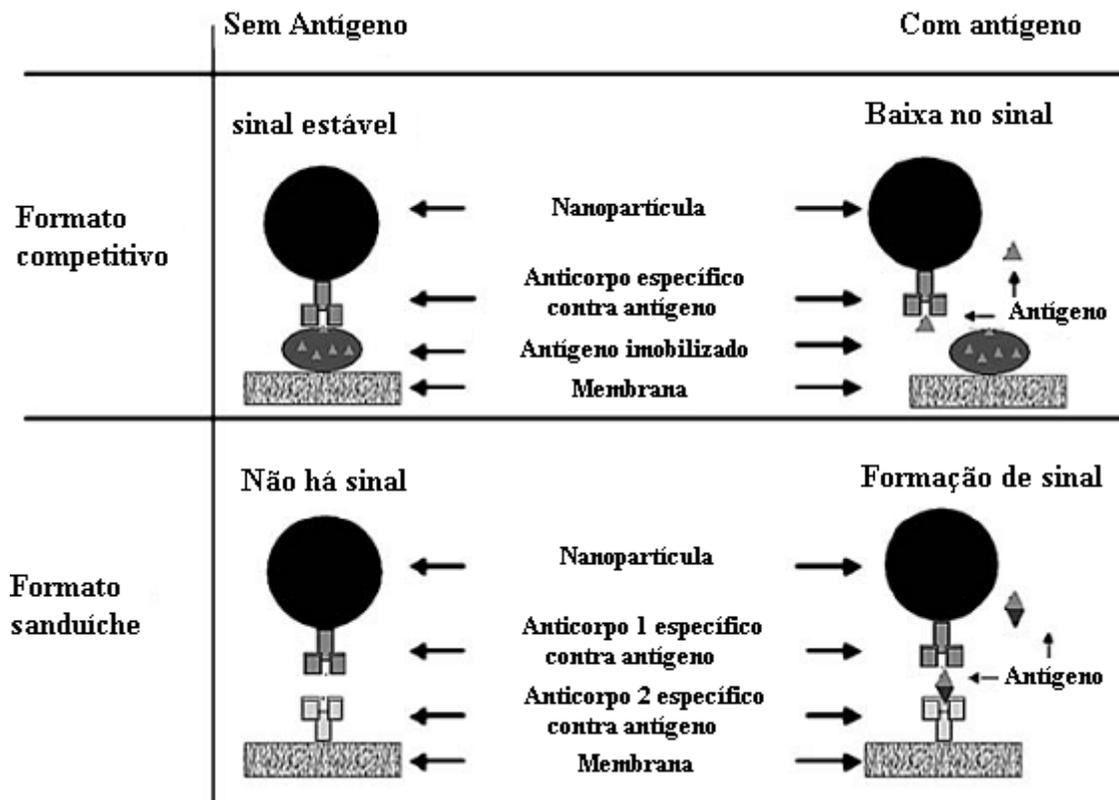


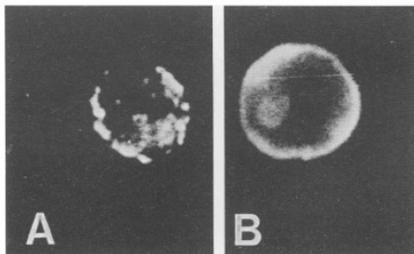
Figura 6 – Diferenças na disposição e na geração de sinal entre o sistema em fluxo lateral competitivo e em sanduíche. No formato competitivo a resposta é negativamente correlacionada à quantidade do antígeno na amostra (parte superior da figura). No formato sanduíche a resposta é diretamente proporcional a quantidade de antígeno na amostra (parte inferior da figura). FONTE: modificado de POSTHUMA-TRUMPIE *et al.*, 2009.

1.6.2 “Proteína 2 rica em histidina” (HRP2)

Em 1986, uma proteína rica em histidina, denominada Pf-HRP2, foi identificada no *P. falciparum* (WELLEMS & HOWARD., 1986). Rock e colaboradores (1987) descreveram como hemácias infectadas com *P. falciparum* sintetizam três proteínas ricas em histidina (HRP): HRP-1, HRP-2, HRP-3. A HRP-2 (com massa observados em gel SDS-PAGE de 60 à 105 kDa, havendo porém frações menores) foi identificada em todos os parasitas de *P. falciparum*, sendo encontrada fenotipicamente nos

“knobs” de hemácias parasitadas e recuperada em sobrenadantes de cultura. Entretanto a proteína HRP-2 tem distribuição em todos os estágios do parasita de maneira fenotipicamente diferente (Figura 7). Ensaios de imunofluorescências indireta realizados com diferentes anticorpos monoclonais anti HRP-2 mostraram padrões de marcação diferentes, tais como dentro de “vesículas” no citosol do eritrócito, ou periferia ou área marginal ao redor de uma hemácia parasitada com trofozoítos jovem ou trofozoíto maduro, e ainda em esquizontes (PARRA *et al.*, 1991; HOWARD *et al.*, 1986).

1



2

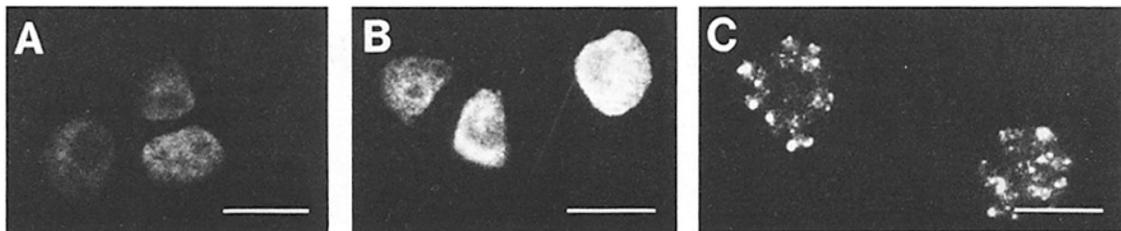


Figura 7 – Distribuição fenotípica do antígeno HRP2. Imunofluorescências indiretas realizadas utilizando diferentes anticorpos monoclonais mostrando padrões de marcação de células vermelhas do sangue de macaco *Aotus*. 1: A – fluorescência dentro de “vesículas” no citosol do eritrócito; B – fluorescência marginal ao redor da hemácia parasitada. 2: A – trofozoíto jovem; B – trofozoíto maduro e esquizonte; C – segmentos. FONTE: PARRA *et al.*, 1991; HOWARD *et al.*, 1986.

Posteriormente, verificou-se sua presença no plasma de pacientes agudamente infectados com *P. falciparum*, sendo considerado então um potente candidato para o diagnóstico específico deste parasita (PARRA *et al.*, 1991). A partir de 1993, houve grande desenvolvimento de testes imunocromatográficos baseados na captura qualitativa da Pf-HRP2, tornando a HRP2 o primeiro antígeno utilizado para este tipo de

diagnóstico. Mais recentemente, métodos de diagnóstico rápido da malária foram desenvolvidos utilizando anticorpos monoclonais e policlonais dirigidos contra a proteína *Pf-HRP2* e contra a enzima lactato desidrogenase das quatro espécies de plasmódio. Estes testes têm a vantagem de diferenciar o *P. falciparum* das demais espécies, as quais são identificadas como não-*P. falciparum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A *HRP2* possui 35% de seus aminoácidos formados por histidina. Seu gene está localizado no cromossomo 7 do *P. falciparum*, com 915 pares de base (não possuindo introns) que codificam uma proteína hidrossolúvel de aproximadamente 32 kDa (PLASMO DB, 2010). Esta massa, porém não é o observado em gel SDS-PAGE, podendo ser visualizado em 60 a 105 kDa. Wellems e Howard (1986) explicam que esta variação pode ocorrer devido a alta taxa de aminoácido alanina, histidina e aspartato encontrados nesta proteína, o que poderia interferir no padrão de migração dela.

A *HRP2* é encontrada predominantemente nos estágios assexuados, mas também pode ser achada em gametócitos jovens (MURRAY *et al.*, 2008). Ela está presente em pequenas quantidades no vacúolo digestivo e é capaz de se ligar a porção heme da hemoglobina e cristalizá-la, formando assim a hemozoína. Contudo, cepas de laboratório “knock-out” para o gene da *HRP2* e *HRP3* ainda são capazes de formar a hemozoína. Isto mostra que a *HRP2* é capaz de formar os cristais de hemozoína, porém não é absolutamente necessária *in vivo* para a formação destes (SULLIVAN & KRISHNA, 2005, p. 301).

Em 2008, Wilson e colaboradores detectaram a presença de *Pf-HRP2* na saliva de pacientes. Visto que em seus ensaios imunoenzimáticos foi observada uma sensibilidade de 43% com amostras de saliva e 53% com amostras de plasma, seguida de especificidade de 100% em ambos os tipos, é possível que a saliva venha a se tornar um modo de detecção não invasivo e custo-efetivo para o diagnóstico da malária.

1.6.3 Produção de anticorpos monoclonais

Como mostrado no tópico 1.6.2, para a preparação de um sistema em fluxo lateral é necessário a produção de anticorpos monoclonais contra o antígeno alvo. Nos últimos 30 anos, a tecnologia de anticorpos monoclonais tem se desenvolvido muito, e sua demanda está em constante crescimento. Devido a sua característica peculiar de alta especificidade e sensibilidade, os anticorpos monoclonais são considerados ferramentas ideais para a pesquisa básica assim como diagnóstico para o câncer e terapêutica. No campo da pesquisa, eles são usados para detectar proteínas na célula na sua forma nativa ou desnaturada. Na terapia médica, por exemplo, para o câncer ou doenças infecciosas, os anticorpos monoclonais possuem vantagens significativas se comparados à quimioterapia (CHIARELLA, 2008).

O primeiro método usado para produzir anticorpos homogêneos de especificidade conhecida foi descrito por Georges Kohler e Cesar Milstein em 1975 e continua sendo usado até hoje. Essa técnica é baseada no fato de que cada linfócito B produz anticorpos de uma especificidade única. Como linfócitos B normais não podem crescer indefinidamente, é preciso imortalizar células B que produzem um anticorpo específico. Isso é obtido por meio da fusão celular, ou hibridização de células somáticas, entre um plasmócito normal e uma célula de mieloma, seguido da seleção das células fundidas que secretam anticorpos da especificidade desejada derivada da célula B normal (Fig. 7) (ABBAS E LICHTMAN, 2005).

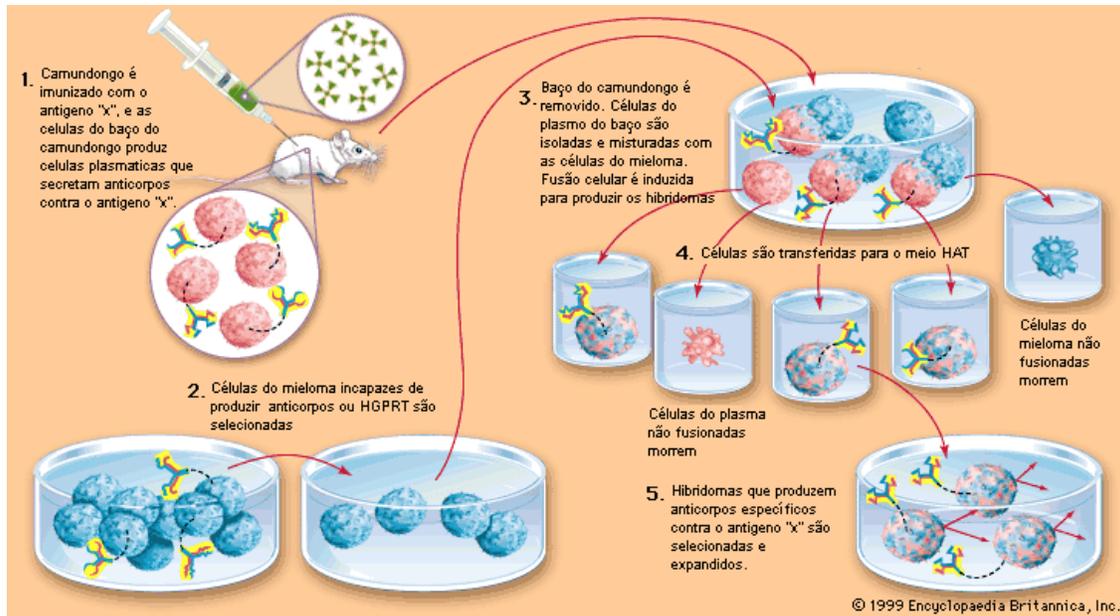


Figura 8 – Produção de anticorpos monoclonais. Na figura podemos observar de forma resumida o processo de produção de anticorpos monoclonais. FONTE: ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA ON-LINE, 1999.

1.7 Retrospectiva dos projetos antecedentes

Em trabalhos anteriores desenvolvidos por esta equipe, foi construído um plasmídeo, através da tecnologia do DNA recombinante, o qual continham o gene da “proteína 2 rica em histidina” (HRP2) de *P. falciparum* (930 pares de base) (Figura 8A) (FILHO, 2005). Tal gene foi inserido em um plasmídeo pGEX-3x (Amershan) a qual fusiona a proteína a uma cauda de Glutathione-S-transferase (GST). Após a indução de sua expressão ser realizada em um hospedeiro bacteriano *E. coli*, esta apresentou aproximadamente 70 kDa, sendo posteriormente purificada através de uma resina de sefarose glutathione (Amershan) (Figura 8B) (SANTOS, 2006).

Com a proteína recombinante purificada (rHRP2-GST), foi realizado um teste primário para verificação da semelhança da proteína recombinante construída e a proteína nativa. Tal ensaio utilizou um “kit” para diagnóstico rápido da malária comercialmente disponível

(Hexagon/AUS), apresentando resultado positivo (FILHO, 2005) (Figura 10), e confirmando a utilização desta proteína recombinante no desenvolvimento de anticorpos monoclonais, os quais poderiam vir a ser utilizados em um TDR nacional.

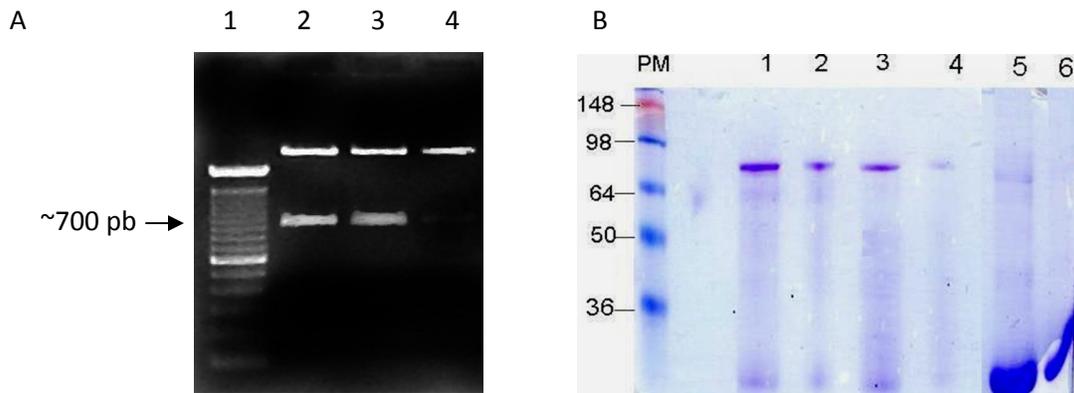


Figura 9. A) Uma das etapas para construção da proteína recombinante rHRP2-GST, correspondente a digestão com *Eco* R1 do plasmídeo pGEM-HRP2 em um gel de agarose. 1) padrão de peso molecular 1kb; 2) colônia branca 2; 3) colônia branca 3; 4) controle com pGEM colônia azul. Seta: banda de 930 pb correspondente ao gene da *HRP2*. B) Verificação da purificação da proteína rHRP2-GST em um gel SDS-PAGE. Cada canaleta corresponde a uma eluição da proteína. Como controle positivo foi utilizado a proteína GST, representada nas canaletas 5 e 6. Fonte: FILHO, 2005; SANTOS, 2006.

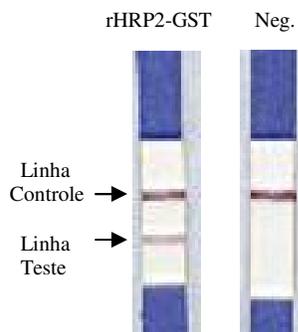


Figura 10 - Teste diagnóstico de malária falciparum (Hexagon/AUS). Kit que utiliza o princípio de imunocaptura de antígeno HRP2 com anticorpos monoclonais fixados em uma tira de papel. A fita que foi colocada em contato com a rHRP2-GST apresentou resultado positivo, dado o aparecimento da linha teste. A fita que entrou em contato apenas a proteína GST com tampão tris-glutationa não apresentou o mesmo resultado. Fonte: FILHO, 2005.

Posteriormente, foram realizadas imunizações com esta proteína recombinante em camundongos Balb/C e coelhos. O soro destes animais foi purificado e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em formato sanduíche foram realizados utilizando soros de pacientes infectados por *P. falciparum* como fonte de antígeno. Nestes testes, foi possível observar que os anticorpos policlonais destes animais foram capazes de

reconhecer a proteína HRP2 nativa no soro de pacientes (Gráfico 2) (SANTOS, 2006), confirmando assim mais uma vez a possibilidade de utilização da rHRP2-GST no desenvolvimento de anticorpos monoclonais.

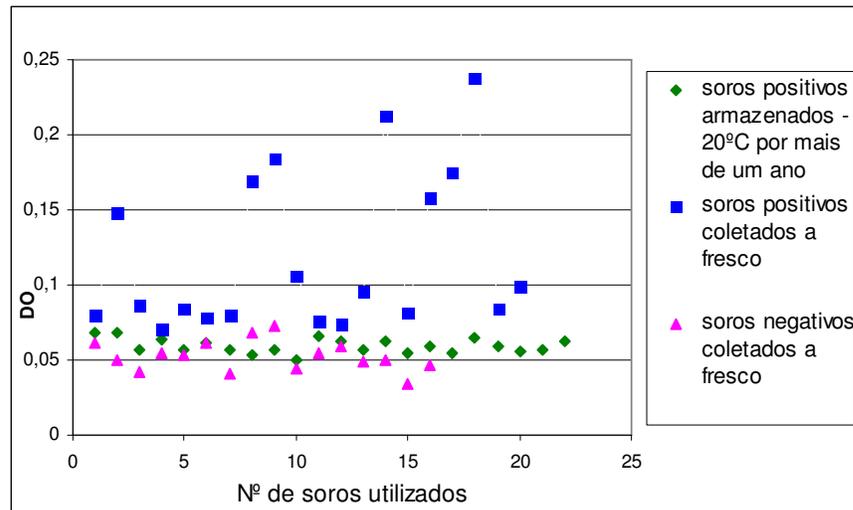


Gráfico 2 - Ensaio da detecção da HRP-2 em plasma de pacientes infectados com malária causada por *P. falciparum*. Este ELISA sanduíche foi realizado com 41 soros de pacientes com malária causada por *P. falciparum* numa diluição de 1/3. Como controle negativo foi utilizado soros de pessoas sem antecedentes de malária. Fonte: SANTOS, 2006.

1.8 Perspectivas da utilização do teste para diagnóstico rápido para malária nacional

Em um estudo realizado no estado do Pará (Oliveira, 2009) sobre custo-efetividade da utilização do teste comercial para diagnóstico rápido da malária OptiMAL® comparada a microscopia, observou-se que em todos os cenários abordados o teste rápido teve menor custo-efetividade. Porém, pode-se notar neste estudo que um dos pontos de maior contribuição para esta conclusão se deve ao elevado preço pago pelo governo federal para a aquisição deste produto, chegando a ser de US\$ 0,60 a 2,50 por teste (Tabela 2).

A produção de um “kit” diagnóstico nacional para malária possibilitaria a utilização deste método em alta escala em áreas endêmicas e áreas de difícil acesso, devido à redução dos gastos federais

para a implementação desta tecnologia no Sistema Único de Saúde. Como exemplo de caso, podemos citar os produtos produzidos por Biomanguinhos, os quais, segundo Maurício Medeiros (2004), proporcionam uma expressiva economia de recursos para o governo federal.

A inclusão destes testes nos programas de cuidados com a saúde pública levaria a avanços ao programa de controle da malária devido as seguintes razões:

- 1) Diminuiria a morbidez e mortalidade ocasionadas pelo difícil acesso ao diagnóstico;
- 2) Aceleraria o processo de tratamento (uma vez que a malária poderia ser identificada em sua fase inicial);
- 3) Diminuiria a ocorrência de erros de interpretação dos resultados ocasionados por baixa parasitemia;
- 4) Diminuiria os encargos públicos vinculados ao diagnóstico de malária, permitindo a intervenção precoce nos casos e esforços mais efetivos no controle da doença;
- 5) Reduziria ainda mais o risco do desenvolvimento de malária grave causada por *P. falciparum* no país.

Além destes pontos, o desenvolvimento das técnicas ligadas ao desenvolvimento deste “kit” diagnóstico no Brasil fortaleceria ainda a formação de uma plataforma de pesquisa que possibilitaria o desenvolvimento de outros testes rápidos para diagnósticos de diversas doenças, principalmente aquelas em que proteínas marcadoras de infecção estejam relacionadas.

CARACTERÍSTICAS E REQUERIMENTOS	MICROSCOPIA	TESTES RÁPIDOS
Equipamentos	Microscópio	Nenhum
Experiência do profissional	Elevada	Mínima – pouco treinamento
Duração do teste	Pode chegar a 60 minutos	15 - 20 minutos
Subjetividade do observador	Alta	Baixa
Custo por teste	US\$ 0.12 – 0.40	US\$ 0.60 – 2.50
Quantificação de parasitos	Sim	Não
Diferenciação entre as 4 espécies	Sim	Não – somente diferencia <i>P. falciparum</i> das demais
Diferenciação entre estádios sexuais e assexuais	Sim	Não
Detecção de persistência antigênica na ausência de formas parasitárias visualizáveis	Não	Sim
Detecção de parasitos seqüestrados	Não	Sim

Tabela 2 – diagnóstico da malária – testes rápidos e microscopia – segundo algumas características e requerimentos. Fonte: OLIVEIRA, 2009 (adaptado a partir de referência da World Health Organization (WHO), 2000; e Iqbal e cols, 2003)

2 - Objetivos

2.1 Geral

Desenvolvimento de um sistema em fluxo lateral para o diagnóstico de malária causada por *Plasmodium falciparum*.

2.2 Específicos

- Purificar a proteína recombinante HRP2-GST visando à imunização de camundongos Balb/C a serem utilizados para obtenção de anticorpos monoclonais;
- Selecionar hibridomas secretores de IgG anti HRP2 por ensaios imunoenzimáticos para realizar clonagem por diluição limite para seleção dos hibridomas estáveis;
- Purificar IgG policlonal e monoclonal anti-HRP2 por cromatografia de afinidade visando o acoplamento em ouro coloidal;
- Padronizar sistema fluxo lateral (“lateral flow”) com anticorpos anti-HRP2 em teste com amostras de pacientes.

3 - Metodología

3.1 Plasmídeo pGEX-HRP2

Para o desenvolvimento dos trabalhos, foi utilizado um plasmídeo construído em projetos anteriores. Nesta construção o gene da HRP2 de 930 pb foi clonado em plasmídeo comercial pGEX-3x (inserido através do sítio para enzima EcoRI) (Figura 12). Na construção o gene HRP-2 é fusionado ao gene de uma proteína de interesse denominada glutathione-S-transferase (GST), que serve para facilitar a purificação da proteína alvo após a expressão da proteína em hospedeiro bacteriano.

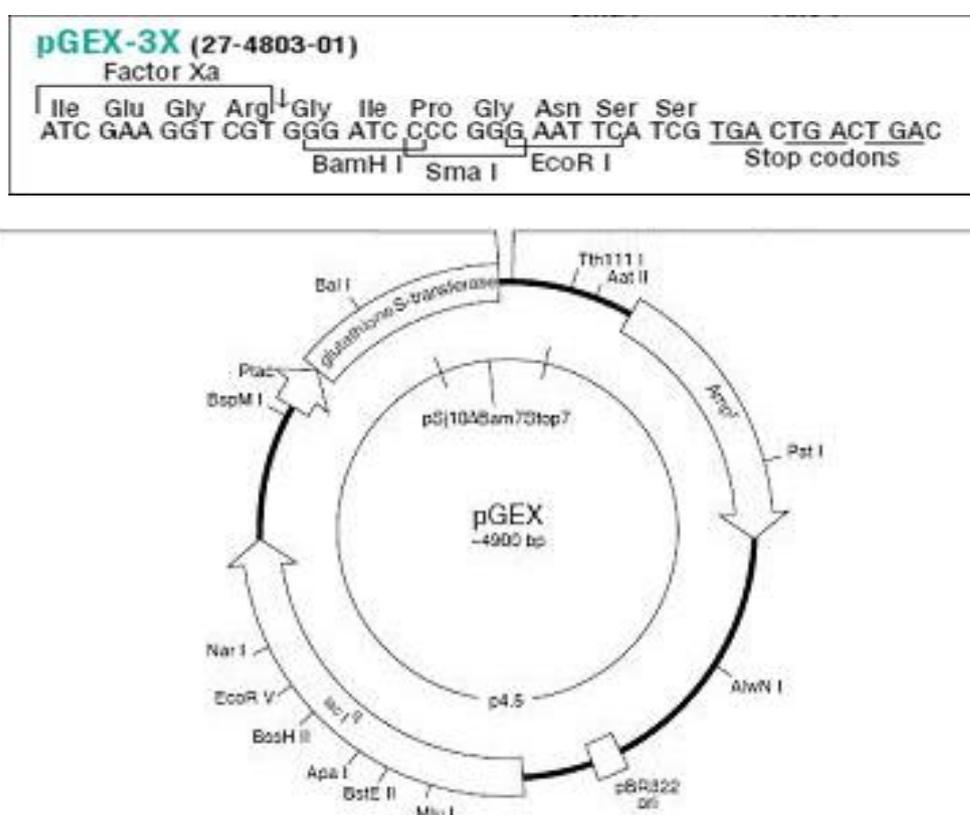


Figura 11 – Mapa do plasmídeo pGEX-3x (Amershan) utilizado em projetos anteriores que visavam a produção de uma proteína recombinante da HRP2. FONTE: GELIFESCENCES, acesso: 16 de agosto de 2010.

3.2 Expressão protéica e análise por SDS-PAGE

Obtido em estudos anteriores desenvolvidos por nossa equipe (FILHO, 2005), o plasmídeo pGEX-*HRP2* foi inserido na bactéria *E. coli*, cepa BL21(DE3)pLysS por transformação seguindo o método de Inoue e colaboradores (1990). Após seleção de uma colônia bacteriana, a colônia é expandida em meio “Luria Bertani Broth” (LB), sob agitação constante (120 rpm), à 37 °C e submetida a uma indução utilizando *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) ou Lactose quando a densidade bacteriana alcançasse 0,6-0,8 após medido em espectrofotômetro a 600nm.

Após padronização da melhor indução da cepa BL21(DE3)pLysS para a produção da proteína *rHRP2-GST*, sendo 3 horas utilizando o indutor IPTG ou Lactose, a proteína recombinante foi produzida pela bactéria, em seguida, a cultura bacteriana foi centrifugada e o precipitado estocado a -80 °C, até o momento da lise celular. A visualização da produção da proteína *rHRP2-GST* cepa BL21(DE3)pLysS foi realizada em SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) (LAEMMLI, 1970).

3.3 Lise celular e purificação das proteínas recombinantes

Para a lise celular, foi seguido o protocolo proposto por Harper e , mk Speicher (1997), com alterações feitas por nossa equipe. Logo, os “pellets” de indução foram descongelados e ressuspensos com tampão de lise (50 mM tris base, 5mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,15 mM PMSF, pH 8,0). Estes foram sonicados (utilizando o aparelho UP100H – Dr. Hielsher) nas seguintes frequências e tempos: 20/30”, 40/30”, 40/15”+60/15”, 60/15”+80/15”, 80/15”+100/15”; sendo cada etapa intercalada com banho de gelo das amostras por 30 segundos. O lisado foi centrifugado à 14 000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Pellet e sobrenadante foram então separados, sendo o segundo recuperado.

A purificação da proteína recombinante seguiu o método proposto pelo fabricante da resina “sepharose glutaciona” (Amersham), apresentando, porém, alterações desenvolvidas por nossa equipe. Logo, o sobrenadante do lisado bacteriano ficou em contato com a resina por uma hora, sob agitação constante. Após dez lavagens com tampão PBS (anexo 2) contendo PMSF (0,15 mM final) e EDTA (5 mM final), a proteína foi eluída com um tampão contendo glutaciona reduzida (10 mM final, juntamente com 50 mM de Tris base, pH 8,0) e conservada a -20°C. A confirmação da purificação foi feita em gel SDS-PAGE e a quantificação da proteína pelo método de Bradford (Bio-Rad). No SDS-PAGE, cinco microlitros de cada amostra foram aplicadas no gel. Os pellets das amostras de “lisado total da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS coletados antes da indução” e “porção insolúvel da bactéria induzida” foram pesados, este peso multiplicado por 6.5 (número estimado empiricamente), sendo o resultado desta conta o volume de tampão de amostra em que o pellet fora ressuspensionado. Para as demais amostras, o tampão de amostra era utilizado a 50% final.

3.4 ELISA

Os “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays” (ELISA) seguiram o protocolo proposto por Harlow e Lane (1988). Foram realizadas duas condições:

3.4.1 ELISA indireto para pesquisa de anticorpo:

A titulação dos anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados com a proteína *rHRP2-GST* e a seleção inicial dos hibridomas foi realizada por ELISA indireto.

Placas de microtitulação de 96 orifícios (NUNC/Marxisorp) foram sensibilizadas por 16 horas a 4° C em câmara úmida, com 50 µl por poço de uma solução contendo 4µg/mL de antígeno diluído em tampão

carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6. Após este período, as placas foram lavadas com PBS 1X contendo 0,05% de Tween 20 e em seguida, bloqueadas por 4 horas a 37° C com uma solução de PBS 1X com 5% de leite desnatado (200µl/poço). Soros dos animais imunizados em diferentes diluições ou sobrenadante de cultura de hibridomas não diluídos foram adicionando a 50 µl finais de cada poço. Estas placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens com PBS 1X contendo 0,05% de Tween 20, foram adicionados, em cada orifício da placa, 50 µl do anticorpo Conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (KPL) na diluição de 1/1000 e incubada novamente a 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após novo ciclo de três lavagens, foram adicionados 50 µl de substrato cromogênico em cada poço (1mg/mL de TMB diluído em 9 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0, mais 4 µl de H₂O₂ à 30%) sendo as placas incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente sob abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 µl de H₂SO₄ 2N.

A intensidade da reação foi determinada pela leitura da densidade óptica (D.O.) a 450 nm (Multiskan).

3.4.2 ELISA sanduíche para pesquisa do antígeno:

Placas de microtitulação de 96 orifícios (NUNC/Marxisorp) foram sensibilizadas por 16 horas a 4° C em câmara úmida, com 50 µl por poço de uma solução contendo 4µg/mL de anticorpos de coelho anti-rHRP2-GST (obtido em estudos anteriores [SANTOS, 2006]) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6. Após este período, as placas foram lavadas com PBS 1X contendo 0,05% de Tween 20 e em seguida, bloqueadas por 4 horas a 37° C com uma solução de PBS 1X com 5% de leite desnatado (400µl/poço). Em seguida, soro ou hemácia de pacientes (com hematócrito constante de 25%, lisadas na presença de triton x-100 a 0,001% final) com *Plasmodium falciparum* (CEP/UFAM 265/2006, anexo 2) foram adicionados em cada poço num volume de 50 µl e incubados por 16 horas à 4 °C. Na mesma placa estavam presentes

controles com soro ou hemácia de pessoas que nunca foram infectadas com o parasita.

Passado este período, 50 µl de sobrenadante de cultura de hibridomas foi adicionado sem diluição em cada poço. Estas placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida ou por 16 horas a 4°C. Após três lavagens com PBS 1X contendo 0,01% de Tween 20, foram adicionados, em cada orifício da placa, 50 µl do anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo, conjugado com a enzima “horseradish peroxidase” (KPL), na diluição de 1/500 e incubada novamente por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após novo ciclo de três lavagens, foram adicionados 50 µl de substrato cromogênico em cada poço (1mg/mL de TMB diluído em 9 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0, mais 4 µl de H₂O₂ à 30%) sendo as placas incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente sem a presença da luz. A reação foi interrompida com 50 µl de H₂SO₄ 2N.

A reação foi quantificada por leitura da densidade óptica (D.O.) a 450 nm (Multiskan).

3.5 Imunização de camundongos Balb/C

Camundongos da linhagem Balb/C foram imunizados via peritônio com a proteína rHRP2-GST purificada (1 mg/ml) somadas (volume/volume) com o adjuvante de “Freund completo”. Duas semanas depois da primeira inoculação foi realizado o reforço com a proteína juntamente com adjuvante de “freund incompleto” (volume/volume) e após mais duas semanas foi realizado o reforço final no animal (HARLOW e LANE, 1988). Antes de cada imunização foi retirado o sangue dos animais imunizados através de um corte em sua cauda. Um ELISA indireto foi feito utilizando estes soros para detectar a reatividade deste com a proteína recombinante. Outros animais foram imunizados apenas com adjuvante (diluído a 50% com solução salina), servindo assim como controle do ensaio.

3.6 Descongelamento, cultura e congelamento de hibridomas produtores de anticorpos anti-GST e mielomas

As células estocadas em nitrogênio líquido foram retiradas, deixadas por alguns minutos no gelo e descongeladas a temperatura ambiente (TA). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com meio DMEM (DULBECCO), ressuspensas com 10 mL do mesmo meio contendo soro fetal bovino (CULTILAB). Esta ressuspensão foi então transferida para uma garrafa de cultivo (50 mL) e colocadas em uma estufa a 37 °C, 5% CO₂. O crescimento das células foi acompanhado diariamente.

Confirmada a viabilidade dos hibridomas anti-GST após o descongelamento, o sobrenadante foi retirado (de acordo com o crescimento celular) e estocado a -20 °C. Neste crescimento, foi acrescentado meio estéril para continuar o cultivo celular. Quando o crescimento celular atingiu confluência, estas foram diluídas com meio e separadas em outra garrafa. O mieloma (SP2-OAg14) foi cultivado de forma semelhante com meio DMEM sendo priorizado seu crescimento exponencial para a realização da fusão.

Para o congelamento das células, foi verificado o número de células vivas na garrafa. Após confirmado um baixo número de células mortas, a cultura era ressuspensa suavemente, tentando obter o máximo de células. Estas foram centrifugadas a 500 x g, por 5 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e o “pellet” ressuspensa com soro fetal bovino, sendo acrescentados 10% de DMSO no volume final obtido. A amostra foi então colocada a -80 °C, por 24 horas, seguindo então ao nitrogênio líquido.

3.7 Obtenção de células peritoneais de camundongo

Para a obtenção de um “feeder layer” de fibroblatos e macrófagos, 5 mL de DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (DMEM +) foram injetados, um dia antes da fusão, na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. O abdome foi massageado por alguns minutos e o lavado peritoneal recuperado assepticamente com o auxílio de uma seringa. Em seguida, 45 mL de DMEM+ foram adicionados a este lavado peritoneal, sendo que a suspensão final foi distribuída em placas de cultura com 96 poços (100 µL/poço) e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até o momento do uso (Tanjoni, 2002, pag. 34).

3.8 Produção de anticorpos monoclonais

A produção de anticorpos monoclonais seguiu o método proposto por Harlow e Lane (1988) (figura 12). Três dias após o reforço final nos camundongos, o baço destes animais foi removido e colocado em um recipiente contendo 10 mL de meio incompleto (meio sem soro fetal bovino). O baço foi desfeito com a ajuda de uma peneira estéril e macerado com bastão de vidro estéril, transferido para um tubo estéril, deixado por aproximadamente 2 minutos descansando, sendo então separados sedimentos e sobrenadante por centrifugação.

Os “pellets” das células foram ressuspensos com meio incompleto, sendo então misturados na razão de 2 esplenócitos para 1 mieloma, centrifugados e ressuspensos com 1 mL de uma solução PEG 1500 50% pra permitir a fusão celular. Após 90 segundos à 37 °C, foi adicionada à suspensão de células 1 ml de meio DMEM por 60 segundos. Após, foram adicionados mais 20 ml de meio incompleto (por 4 minutos, sob agitação manual constante) à suspensão. A amostra foi colocada em repouso por 4 minutos, a 37 °C, sendo em seguida centrifugada (5 minutos, 500g) e ressuspensa em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e HAT (Hipoxantina aminopterina timidina). Em seguida, a

amostra foi deixada em repouso por 3 horas (37 °C, na estufa). Tal ressuspensão foi distribuída em uma placa de 96 “well” (120 µl de ressuspensão por poço contendo células peritoneais de camundongo), colocada a 37°C, 5% CO₂. Após os três primeiros dias, o meio foi trocado em dias alternados até o aparecimento dos clones. Os clones foram visíveis por microscopia por volta de 4º dia e a olho nu por volta do 7º ou 8º dia. Uma semana após a fusão, substitui-se o meio contendo HAT por meio DMEM contendo HT (Hipoxantina timidina). Com três semanas, troca-se o meio para DMEM completo (contendo 10% de soro fetal bovino).

Aproximadamente 10 dias após a fusão, foi realizada a primeira seleção dos clones por ELISA indireto e sanduíche com o sobrenadante de cultura. No primeiro, é analisado a reatividade dos clones contra as proteínas rHRP2-GST e GST. No último, são utilizados soro de pacientes que foram infectados com *P. falciparum*. Os clones com maior positividade para rHRP2-GST e nativa, ou seja, que estavam produzindo anticorpos que reconheciam a proteína alvo, foram expandidos e estocados. Após estocagem, os hibridomas foram separados em poços individuais pela técnica de diluição limitante. Nesta, as células foram diluídas primeiramente à 500 células/mL, seguida de uma diluição à 50 cél./mL e 5 cél./mL. Com esta última, foram colocados 0,2 mL em cada poço, atingindo assim a proporção de uma célula por poço. Após as células ocuparem metade do poço, o sobrenadante destas foram retidos e submetidos a uma nova seleção por ELISA indireto contra rHRP2-GST e GST. Em seguida, os sobrenadantes de cultura positivos neste último teste foram submetidos a um ELISA sanduíche utilizando como fonte de antígenos hemácias parasitadas com *Plasmodium falciparum* (tópico 3.4.2). Os hibridomas positivos neste foram expandidos e estocados.

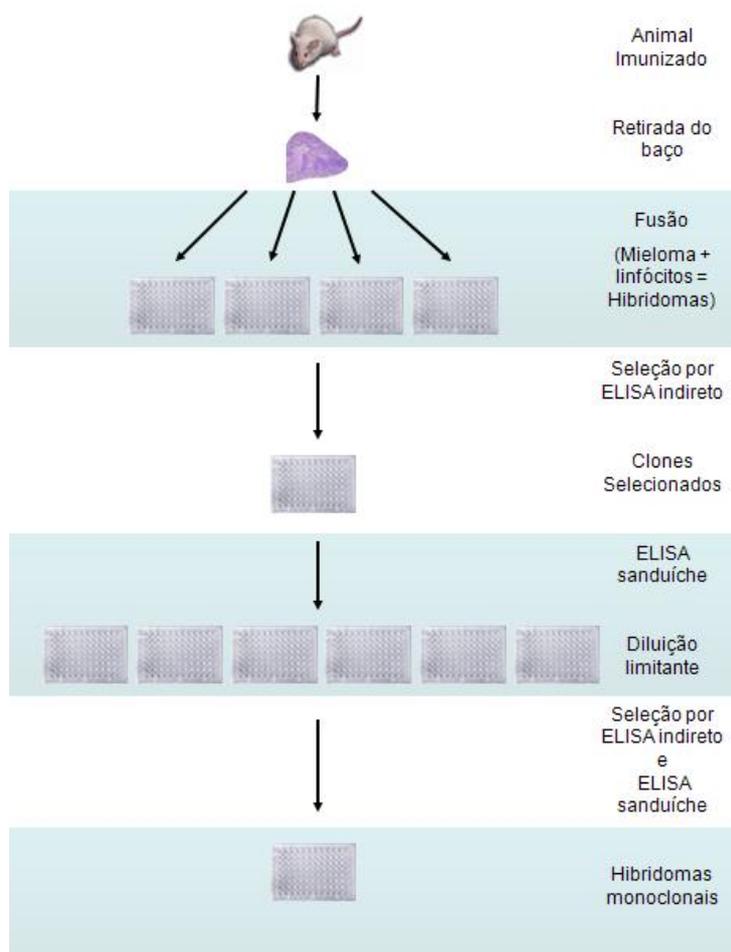


Figura 12 – Esquema das etapas envolvidas na produção de anticorpos monoclonais. O baço do camundongo é retirado, processado e seus linfócitos fusionados a células de mieloma, para formar os hibridomas. Os poços obtidos passam por uma série de seleções por ELISA, são submetidos a uma diluição limitante para a obtenção de hibridomas monoclonais.

3.8.1 Avaliação inicial de especificidade do anticorpo monoclonal contra antígeno HRP-2 nativo através de ELISA sanduíche

Seguindo a metodologia descrita no tópico 3.4.2, dez amostras sanguíneas parasitadas (confirmadas por esfregaço sanguíneo) com *P. falciparum*, *P. vivax* e de indivíduos não infectados (com hematócrito constante de 25%, lisadas na presença de triton x-100 a 0,001% final) foram utilizadas como fonte de antígeno em um ELISA sanduíche para avaliação inicial de especificidade do anticorpo monoclonal “7A” anti-HRP2.

3.9 Imunofluorescência indireta utilizando monoclonal anti-HRP2 e hemácias parasitadas com cultura de P. falciparum

O ensaio com anti-HRP-2 foi realizada em lamínas de imunofluorescência contendo hemácias infectadas com cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum* ou hemácias sadias após fixação com lactose.

A fixação com lactose ocorreu após a lavagem das hemácias infectadas ou hemácias sadias em PBS acrescido de (D+) Lactose à 4 % e posteriormente por gotejamento em cada orifício da lâmina de vidro. Após o gotejamento, o excesso foi aspirado de modo que apenas uma fina película de hemácias fosse deixado para secar à 37 °C por 30 minutos. Para armazenamento, as lâminas foram conservadas a -20 °C.

No momento do uso, as hemácias foram colocadas em contato com o anticorpo monoclonal (20 µl de sobrenadante de cultura não diluído) sendo incubado por 30 minutos à temperatura ambiente numa câmara úmida. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens PBS/Tween, seguida de 30 minutos de incubação com anticorpo secundário (marcado com alexa flúor 488) em uma concentração de 1 para 200, juntamente com o marcador de DNA DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole 2HCl), na concentração de 1 para 100. Após, foram realizadas mais três lavagens, seguida da preparação da lâmina com PBS/glicerol. O ensaio foi então observado em um microscópio de fluorescência (OPTON YX-1, câmera Canon EOS 40D). Em paralelo, um controle utilizando hemácias sadias com o anticorpo monoclonal “7A” anti-HRP2 foi realizado.

3.10 Purificação de anticorpos monoclonais

Primeiramente, o sobrenadante (SN) de cultura hibridomas produtores de anticorpos monoclonais foi submetido a uma precipitação com sulfato de amônia (HARLOW & LANE, 1988). Logo, o SN foi centrifugado a 3000g por 30 minutos. O “pellet” foi descartado e o SN transferido para um Erlenmeyer, e colocado sob um agitador magnético com uma barra de agitação, em banho de gelo. Seguindo a tabela disponível no anexo 3 foi adicionada lentamente a quantidade suficiente de sulfato de amônia para atingir a concentração final de 50%. Após, a solução foi colocada a 4 °C por 16 horas. Em seguida, foi centrifugada a 3000g por 30 minutos, o SN descartado e o pellet ressuspendido com tampão fosfato salina (PBS, receita no anexo 2) a 10% do volume inicial, seguida de uma diálise (membrana de diálise da empresa INLAB, “cut-off” de 12.000 – 16.000 com porosidade 25 ângstrons) com PBS por 16 horas.

Após a diálise, a amostra foi retirada do saco de diálise e submetida a uma purificação por afinidade em coluna de “Proteína A”. A concentração de NaCl na amostra foi ajustada para 3.3 M, sendo ainda adicionado sódio borato (1 M, pH 8,9), com volume correspondente a 10% do volume inicial da amostra. Esta solução foi passada pela coluna de proteína A, sendo esta submetida a 10 colunas de lavagem com NaCl 3 M + 50 mM sódio borato (pH 8,9) e 10 colunas com NaCl 3 M + 10 mM sódio borato (pH 8,9). Em seguida, os anticorpos foram eluídos da coluna com 500 µL de 100 mM de glicina (pH 3,0) e recolhidas em um tubo de ensaio contendo 50 µL de Tris 1 M (pH 8,0). A presença de proteínas nas eluições foi monitorada pelo método de Brad Ford (Bio-Rad). Os eluatos foram, em seguida, submetidos a uma concentração em coluna YM-50 (Millipore), seguindo o protocolo do fabricante. A amostra foi estocada à -20 °C até o momento do uso.

3.11 Acoplamento dos anticorpos ao ouro coloidal e montagem do sistema em fluxo lateral (Lateral flow)

Seguindo o método proposto por Mikawa (2006), com alterações desenvolvidas por nossa equipe, fitas de 0,5 cm de cartões com membrana “Hiflow plus” (Tipo HF 135 6 cm x 30cm, Milipore) foram colocadas em contato com tampão 1 (Tris HCl, 0,1 M; glicerol) por 15 minutos e deixadas para secar a 37 °C por 16 horas. Após, foram gotejadas nessas fitas 1 µL de proteína na linha controle e linha teste (as proteínas utilizadas variaram de acordo com o teste realizado) nas alturas de 4,2 e 3,7 cm, respectivamente, partindo da porção inferior da fita. Após, as fitas foram incubadas a 37 °C por 2 horas. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 15 min. com o tampão 2 (Tris HCl 0,1 M; Caseína), lavadas com Na₂HPO₄ por 3 vezes e deixadas a 37 °C por 2 horas. Logo, a porção adesiva inferior foi cortada e na superior colada uma membrana absorvente.

Paralelamente ao processo descrito acima, 20 µL de ouro coloidal (SIGMA, 20 mM, aproximadamente 0,01% HAuCl₄) foram colocados em contato com 300 µL de anticorpo monoclonal anti-GST (15 µg/mL, dialisado em tampão Na₂HPO₄ 10mM pH 7,5) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, 25 µl do tampão 3 (Tris HCl 0,1 M; BSA) foram colocados e a solução foi deixada por 30 min. a temp. ambiente. Após, esta foi centrifugada por 30 min., 1.000 x g, 4 °C. O sobrenadante foi então descartado e o “pellet” ressuscitado com 1 mL do tampão 4 (Tris 0,1 M; caseína) e centrifugado novamente. O novo “pellet” foi ressuscitado novamente 5 µL do tampão 4 sendo então o material mantido a 4 °C até o momento do uso.

3.12 Padronização do sistema em fluxo lateral competitivo utilizando anticorpos monoclonais anti-GST

Para a padronização do sistema em fluxo lateral, foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-GST obtido em estudos anteriores realizados por nossa equipe. Para tanto, o anticorpo monoclonal foi purificado e acoplado ao ouro coloidal como explicado nos tópicos 3.10 e 3.11. Na membrana de nitrocelulose, foram aplicados o anti-IgG camundongo (0,2 µg/µL Invitrogen, que reconhece tanto a fração leve quanto pesada do anticorpo) e a proteína recombinante rHRP2-GST (3 µg/µl). As amostras da fase móvel continham 50% de soro normal de humanos, PBS, 0,1 M de uréia e 4 µL de anticorpo monoclonal anti-GST marcado com ouro coloidal (Solução A). Quatro condições foram testadas (variando apenas a quantidade de antígeno na solução A): 0, 1, 5, 10 µL de recombinante rHRP2-GST (2 µg/µL) (figura 13).

Os itens mencionados no parágrafo anterior foram colocados em contato por 1 min. (em um microtubo de 2 ml) sendo em seguida colocada a membrana de fluxo lateral previamente preparada. Após 10 min., a fita foi transferida para outro microtubo contendo PBS 1x por 5 minutos.

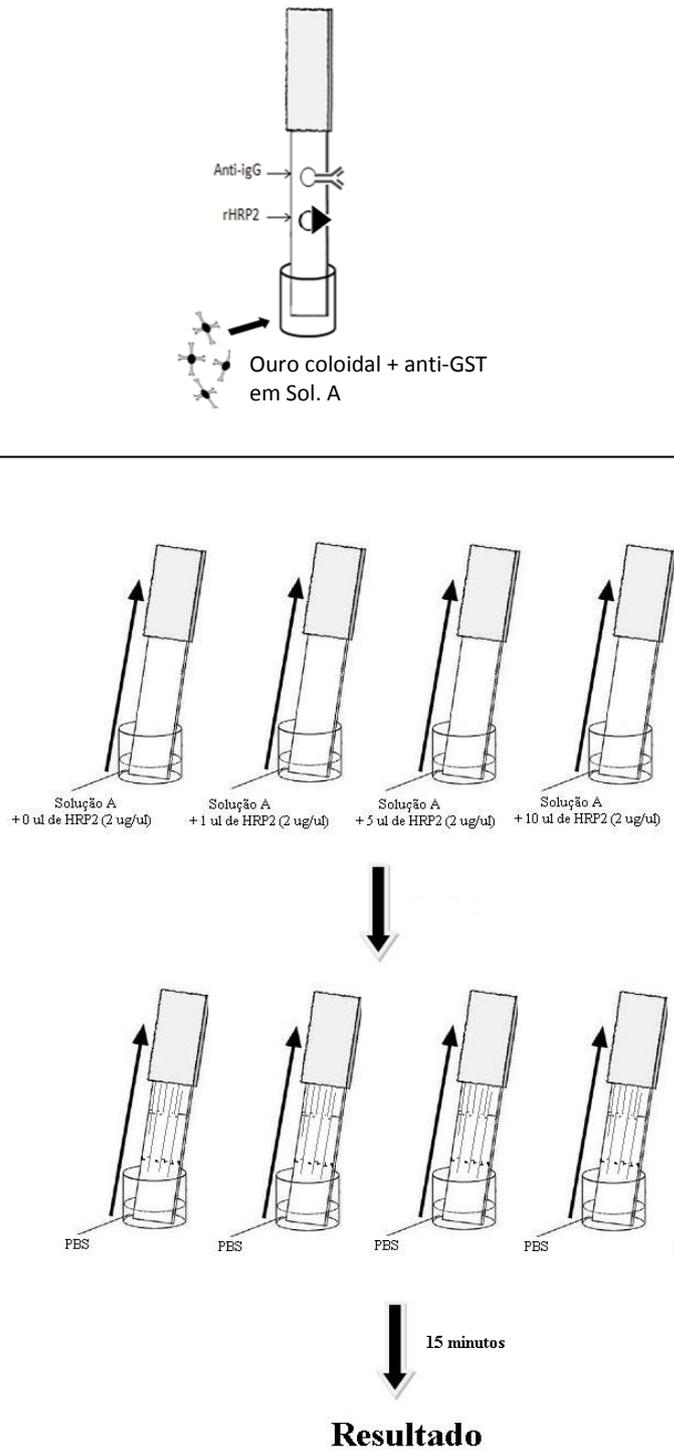


Figura 13 – Procedimento realizado para teste em fluxo lateral competitivo com Anti-GST. O ouro coloidal contendo anticorpos anti-GST acoplados foram colocados em contato (por 1 minuto [não mostrado na figura]) com o antígeno rHRP2-GST na fase móvel do sistema em diferentes concentrações (0, 1, 5, 10µL; 2µg/µl). Este conjugado foi colocado para fluir por capilaridade na membrana de nitrocelulose, e em seguida a membrana foi lavada por fluxo com PBS. Após 15 minutos foi possível observar o resultado.

3.13 Padronização do sistema em fluxo lateral em formato sanduíche utilizando anticorpos policlonais de camundongo anti-rHRP2-GST e anticorpo monoclonal anti-HRP2

Para a padronização do sistema em fluxo lateral em formato sanduíche foram utilizados anticorpos policlonais anti-HRP2 purificados (5,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Para esta purificação, o soro dos animais imunizados com rHRP2-GST (tópico 3.5) foram purificados seguindo a metodologia do tópico 3.10. Logo, os anticorpos policlonais foram acoplados ao ouro coloidal como explicado no tópico 3.11. Porém, após o tratamento mencionado, o ouro coloidal foi aplicado em fibra de vidro e colocado diretamente em um liofilizador por 16 horas. Esta fibra de vidro foi colocada na porção inferior da membrana de nitrocelulose (Figura 14A).

Na membrana de nitrocelulose foram aplicados 1 μL da proteína recombinante rHRP2-GST (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) na linha controle e 1 μL dos mesmos anticorpos policlonais aqui mencionado na linha teste, ambos contendo 5% de etanol.

As amostras da fase móvel foram divididas em 3 tipos:

1. Amostras sanguíneas: contendo 150 μl de tampão de amostra (PBS, 0.7% sacarose, 0.1% tween, 1% triton e 1% BSA), 30 μl de hemácias parasitadas por *P. falciparum* confirmadas em diagnóstico por gota espessa, ou 30 μl de hemácias de pessoas que nunca foram infectadas pelos parasitas;
2. Controle positivo: contendo 180 μl de tampão de amostra e 1 μl de rHRP2-GST (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$);
3. Controle negativo: contendo apenas 180 μl de tampão de amostra.

Os itens mencionados no parágrafo anterior foram colocados em contato por 1 minuto (em um microtubo de 2 ml) sendo em seguida

colocada a membrana de fluxo lateral previamente preparada. Após 10 min., a fita foi transferida para outro microtubo contendo tampão de amostra até o resultado ficar visível.

Após a adição da amostra, ocorria a migração e o reconhecimento dos anticorpos ligado ao ouro ao antígeno HRP2, caso presente. Havia, então, a formação do complexo “ouro-anticorpo-antígeno” e durante a migração pela membrana de nitrocelulose a formação do complexo “ouro-anticorpo-antígeno-anticorpo” na linha teste. O acúmulo destes complexos promovia a formação de uma banda visível a olho nu (Figura 14B). Na linha controle, havia a formação do complexo “ouro-anticorpo-rHRP2-GST”.

Para o teste com o anticorpo monoclonal, foram testadas duas condições:

1. O anticorpo monoclonal acoplado ao ouro coloidal, mantendo anticorpos policlonais de camundongo anti-rHRP2-GST na fita de nitrocelulose na linha teste e proteína rHRP2-GST na linha controle;
2. Os anticorpos policlonais acoplados ao ouro coloidal e o anticorpo monoclonal imobilizado na fita de nitrocelulose.

O mAb foi purificado como descrito no tópico 3.9. Os tipos de amostras testadas foram as mesmas mencionadas anteriormente neste sub-tópico.

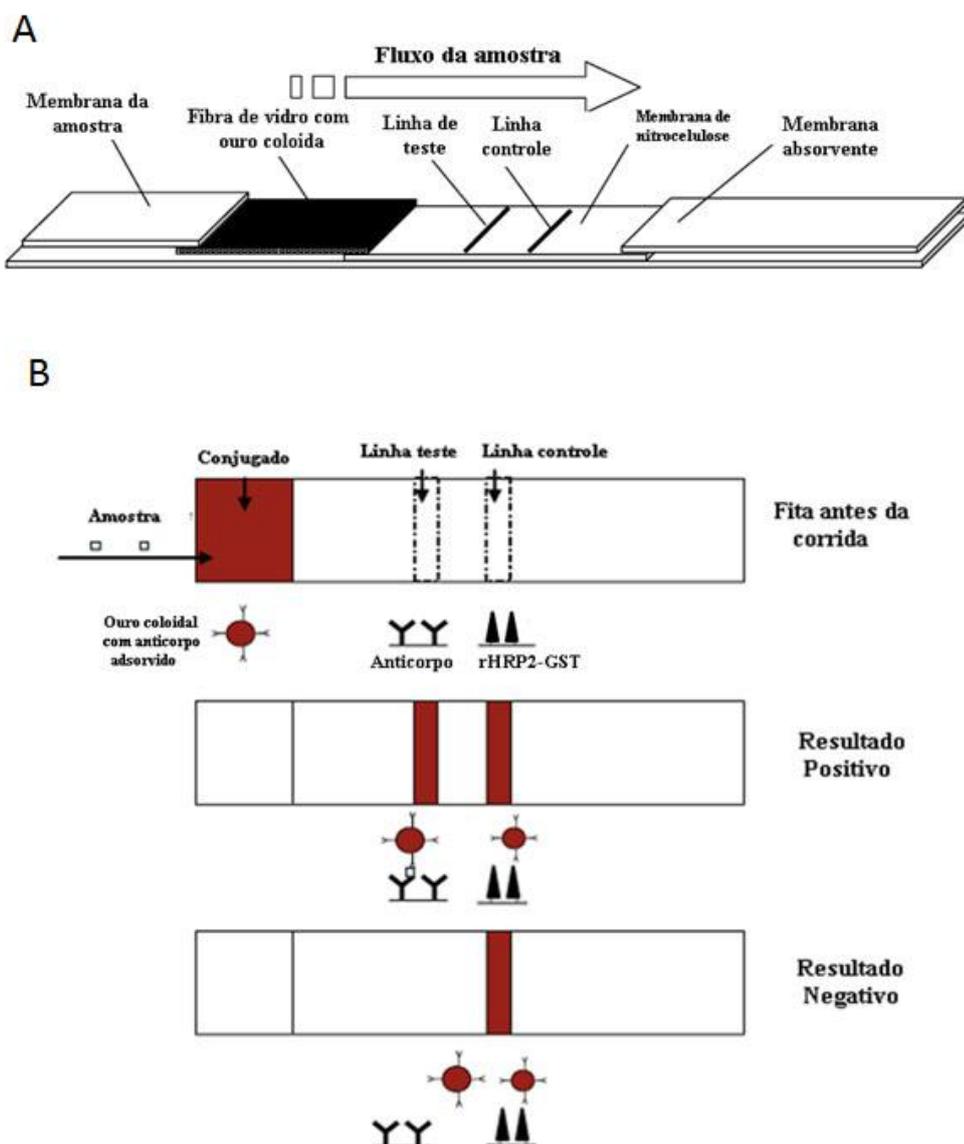


Figura 14. Esquemas da montagem e do teste fluxo lateral desenvolvido neste trabalho. A) Esquema mostrando a posição de cada componente da fita imunocromatográfica montada. Fonte: ZHANG *et al.*, 2009. B) Na fita imunocromatográfica estavam presentes a rHRP2-GST na linha controle e o anticorpo policlonal de camundongo anti-rHRP2-GST na linha teste. No ouro coloidal estava presente o mesmo anticorpo policlonal ou anticorpo monoclonal anti-HRP2. Nas condições onde ocorreu o resultado positivo, houve a formação de um reconhecimento entre anticorpo da linha teste, antígeno presente na amostra e anticorpo conjugado ao ouro coloidal. Nos resultados negativos, não houve a formação deste “sanduíche”. Nas duas condições houve o reconhecimento do antígeno rHRP2-GST presente na linha controle. Fonte: alterado de O’Farrell, 2009.

3.13 Testes de estabilidade do ouro coloidal e fita imunocromatográfica

Foram realizados testes para monitorar a estabilidade do ouro coloidal sob diferentes situações de estocagem. Para tanto, o ouro coloidal foi preparado com anticorpos policlonais de camundongo anti-rHRP2-GST (tópico 3.11) e submetido as seguintes condições:

1. Sem liofilização, o ouro acoplado ao anticorpo foi deixado a temperatura ambiente por uma semana;
2. Sem liofilização, o ouro acoplado ao anticorpo foi estocado a 4 °C por uma semana;
3. Com liofilização, o ouro acoplado ao anticorpo foi estocado por um mês a 4 °C e temperatura ambiente.

Em cada teste, as fitas utilizadas foram preparadas (tópico 3.11) no dia com rHRP2-GST (1µl a 1µg/µl). Para o teste de estabilidade da fita imunocromatográfica, esta foi preparada e deixada por dois meses a temperatura ambiente. O ouro coloidal utilizado neste teste foi preparado no dia contendo anticorpos policlonais de camundongo anti-rHRP2-GST.

Em todos os ensaios, houve apenas o reconhecimento direto dos anticorpos policlonais à proteína recombinante, não sendo testada a formação de um sistema de fluxo lateral no formato sanduíche.

4 - Resultados

4.1 Expressão e Purificação da proteína recombinante rHRP2-GST

Após a indução da cepa bacteriana para a expressão da proteína recombinante rHRP2-GST em diferentes condições (tópico 3.2), os sobrenadantes dos lisados celulares foram submetidos a uma purificação por afinidade (tópico 3.3). O resultado obtido está ilustrado na figura 15. Nesta, nas condições “A e C”, é possível observar claramente que a banda protéica correspondente a rHRP2-GST induzida (sinalizada pela seta pontilhada) na canaleta “3” (correspondente ao sobrenadante do lisado celular) não está presente na canaleta “5” (o mesmo sobrenadante após ser colocado em contato a resina de “sepharose glutaciona”), mostrando que o sistema de purificação utilizado funcionou como esperado, capturando a molécula alvo.

Nas quatro condições testadas, podemos observar a presença de uma série de proteínas de tamanho inferior ao da proteína expressada, que possui peso aparente aproximado de 70 kDa (figura 15, canaletas “6-9”). Tais proteínas permanecem nos eluatos independente do número de lavagens que a submetemos. Visto isso, pode-se sugerir que estas moléculas sejam produtos de clivagem da própria HRP2 recombinante que ocorrem durante o processo de indução, já que em todo o processo de purificação há a presença de inibidor de protease PMSF (“phenylmethylsulfonyl fluoride”) e do quelante de íons bivalentes EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

Outro indício que favorece esta hipótese é que nas duas condições de indução por 16 horas a quantidade de proteína rHRP2-GST no sobrenadante do lisado é reduzida (figura 15 B e D, canaleta 3), podendo ser causada por ação proteolítica no interior da bactéria após longas horas de indução. Para o desenvolvimento do trabalho, foi escolhida a condição que melhor expressava a proteína recombinante e era economicamente mais viável, no caso “Lactose/3 horas/37 °C” (figura 15 A, canaletas “6-9”).

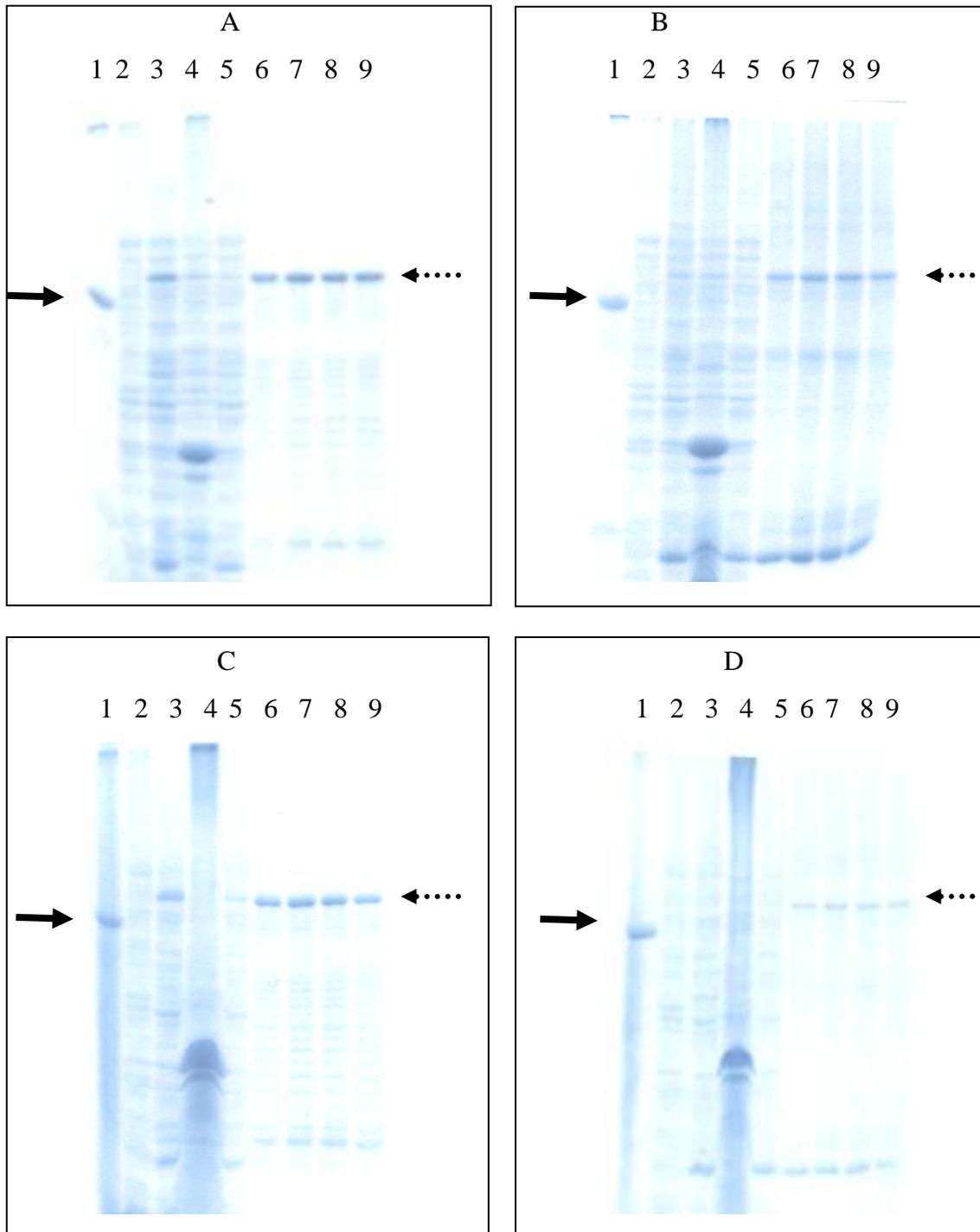
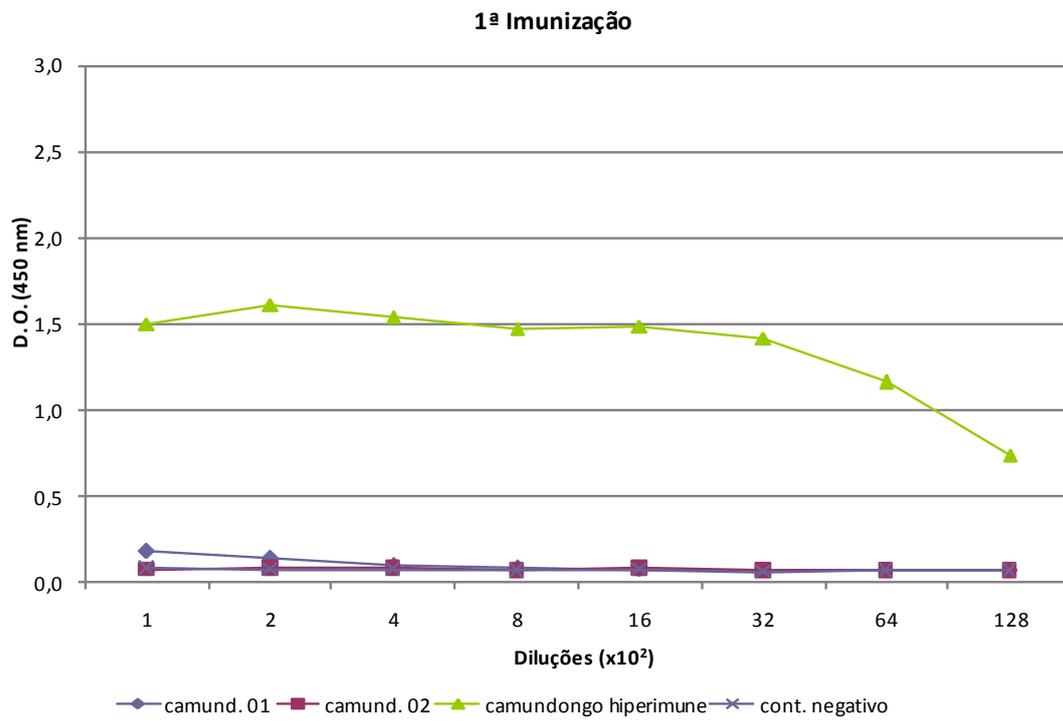


Figura 15 – SDS-PAGE das diferentes condições de purificação da proteína rHRP2-GST. “A”: indução com lactose (10 g/L) por 3 horas; “B”: indução com lactose (10 g/L) por 16 horas; “C”: indução com IPTG (1mM final) por 3 horas; “D”: indução com IPTG (1 mM final) por 16 horas. Canaleta “1”: Padrão de massa molecular (seta cheia representa o peso de 65 kDa); “2”: lisado total da bactéria BL21 (DE3) pLysS antes da indução; “3”: porção solúvel do lisado da bactéria induzida; “4”: porção insolúvel da bactéria induzida; “5”: porção solúvel após contato com a resina de “sepharose glutationa”; “6-9”: eluições da proteína rHRP2-GST (seta pontilhada).

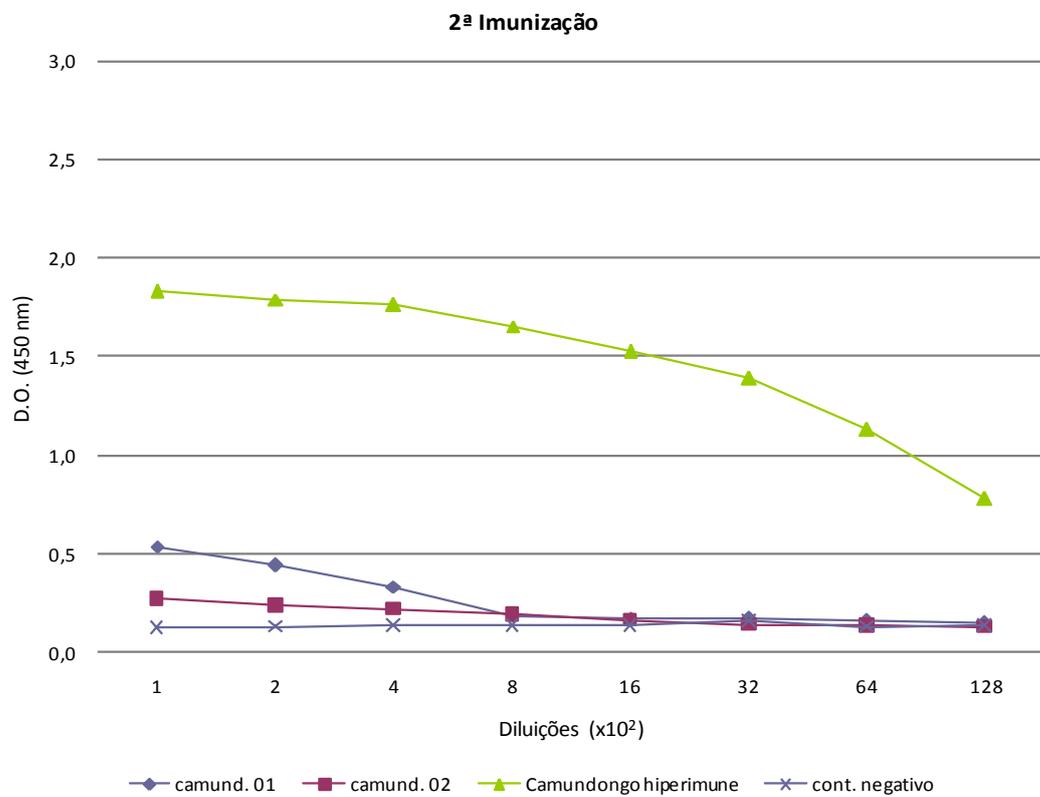
4.2 ELISA com soro dos animais imunizados com rHRP2-GST

Os camundongos imunizados com a proteína rHRP2-GST apresentaram altos títulos de anticorpos da classe IgG total contra a proteína após três imunizações. Como podemos observar nos gráficos 3A e 3B, na primeira e segunda imunizações, o título de anticorpos foi baixíssimo nos camundongos 01 e 02 em relação ao “pool” de soros de camundongos hiperimunizados com a rHRP2-GST. Já na terceira dose, gráfico 3C os títulos foram altos e próximos aquele do soro hiperimune, permanecendo assim nas 3 diluições primeira diluições testadas do soro havendo decréscimo a partir de 1/800. O controle negativo (animal que foi imunizado apenas com adjuvante) não apresentou densidade óptica significativo nos ELISA. Foi escolhido, então, o camundongo “01” para dar continuidade aos testes.

A



B



C

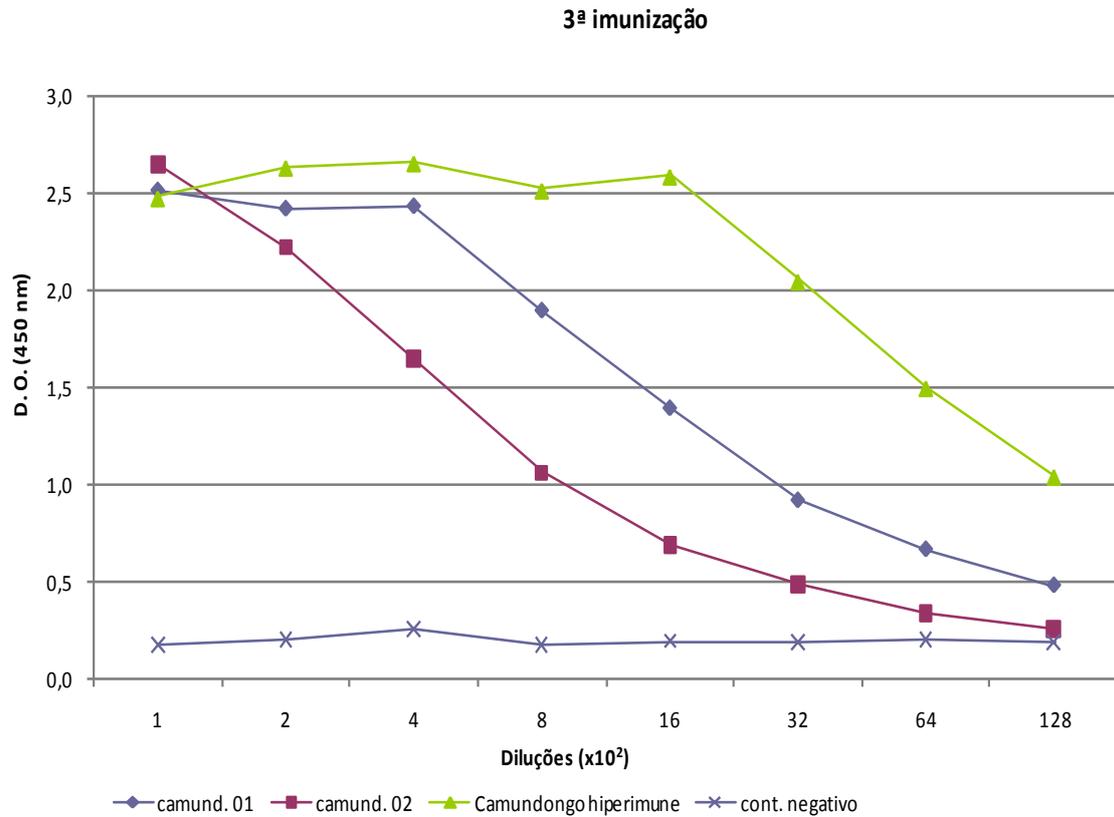


Gráfico 3 – Títulos de anticorpos detectados por ELISA em animais após imunizações. Dois camundongos receberam três doses de mistura de adjuvante de Freund e proteína rHRP2-GST purificada. Na 1ª imunização (Gráfico 3A) foi utilizado adjuvante completo, e nas subsequentes (Gráfico 3B e 3C) incompleto. Quatorze dias após cada uma das imunizações, uma sangria foi feita pela cauda dos animais, sendo este plasma utilizado nas reações sorológicas por ELISA. Controle positivo: “pool” de soros de camundongos imunizados mais de 4 vezes (hiperimune) e controle negativo pool de camundongos normais que não receberam imunizações.

4.3 ELISA dos sobrenadantes de cultura de hibridomas anti-HRP2

Do camundongo 01 foi retirado o baço (após a anestesia do camundongo) e seus linfócitos foram submetidos a uma fusão com células de mieloma. Esta fusão foi realizada com sucesso. Ao total, 368 hibridomas foram testados (contidos em quatro placas de 96 poços, “P1, P2, P3 e P4”), sendo considerados 50 positivos no ELISA indireto contra rHRP2-GST e GST (Gráfico 4). Estes foram submetidos testes ELISA sanduíche contra soros de pacientes com malária causada pelo *P. falciparum* para a seleção dos hibridomas que reagem com a proteína HRP-2 nativa (Gráfico 5).

Seis clones foram selecionados neste ensaio (clones P1 7C, P2 8D, P4 3H, P4 2F, P4 11C e P4 4F, setas alaranjadas no gráfico 5). Até este ponto, as amostras contidas em cada poço são consideradas policlonais. Para torná-las culturas monoclonais, foi realizada a técnica de diluição limite. Logo, seis placas de 96 poços, contendo cada poço um clone individual de hibridomas, foram obtidas, num total de 576 possíveis hibridomas monoclonais. Uma nova seleção foi realizada por ELISA indireto, sendo nesta selecionados 20 clones de hibridomas monoclonais (Gráfico 6).

Com os 20 hibridomas selecionados, foi realizado novamente um ELISA sanduíche desta vez utilizando hemácias lisadas como fonte do HRP-2 nativo. O resultado mostrou apenas 4 hibridomas monoclonais capazes de reconhecer a proteína nativa (Gráfico 7). Aqui vale salientar alguns pontos importantes: 1) Em relação ao antígeno, as amostras biológicas dos pacientes com malária pelo *P. falciparum* utilizadas para a seleção dos hibridomas vieram de uma soroteca e de um banco de hemácias parasitadas armazenadas a -20°C durante meses. É muito provável que o antígeno HRP2 presente tanto do soro quanto no sangue total vem se degradando, visto que o soro policlonal de camundongo anti-rHRP2-GST reagiu com uma densidade ótica semelhante. 2) o anticorpo monoclonal “7A” apresentou uma reatividade superior aos outros anticorpos, incluindo o controle positivo com anticorpos

policlonais purificados de camundongo anti-rHRP2-GST, e por isso foi escolhido para dar continuidade aos trabalhos. 3) Porém, a possibilidade dos outros servirem para o propósito desta tese ainda existe, devido o fato de que as culturas de hibridomas secretam anticorpo de acordo com o manuseio das células.

Logo, foi realizado uma segundo ELISA sanduíche envolvendo apenas o mAb “7A” e dez amostras de pacientes infectados com *P. falciparum*, dez amostras de indivíduos sadios e dez amostras com *P. vivax*. Apesar das dificuldades mencionadas acima, o ELISA sanduíche mostrou dados muito interessantes (gráfico 8). A reatividade do mAb 7A foi sempre superior contra as hemácias parasitadas com *P. falciparum* do que a do controle com hemácias sadias e de paciente com *P. vivax*. Estes resultados indicaram a especificidade do mAb 7A em detectar o antígeno HRP2 apenas em pacientes com malária causada pelo *P. falciparum*.

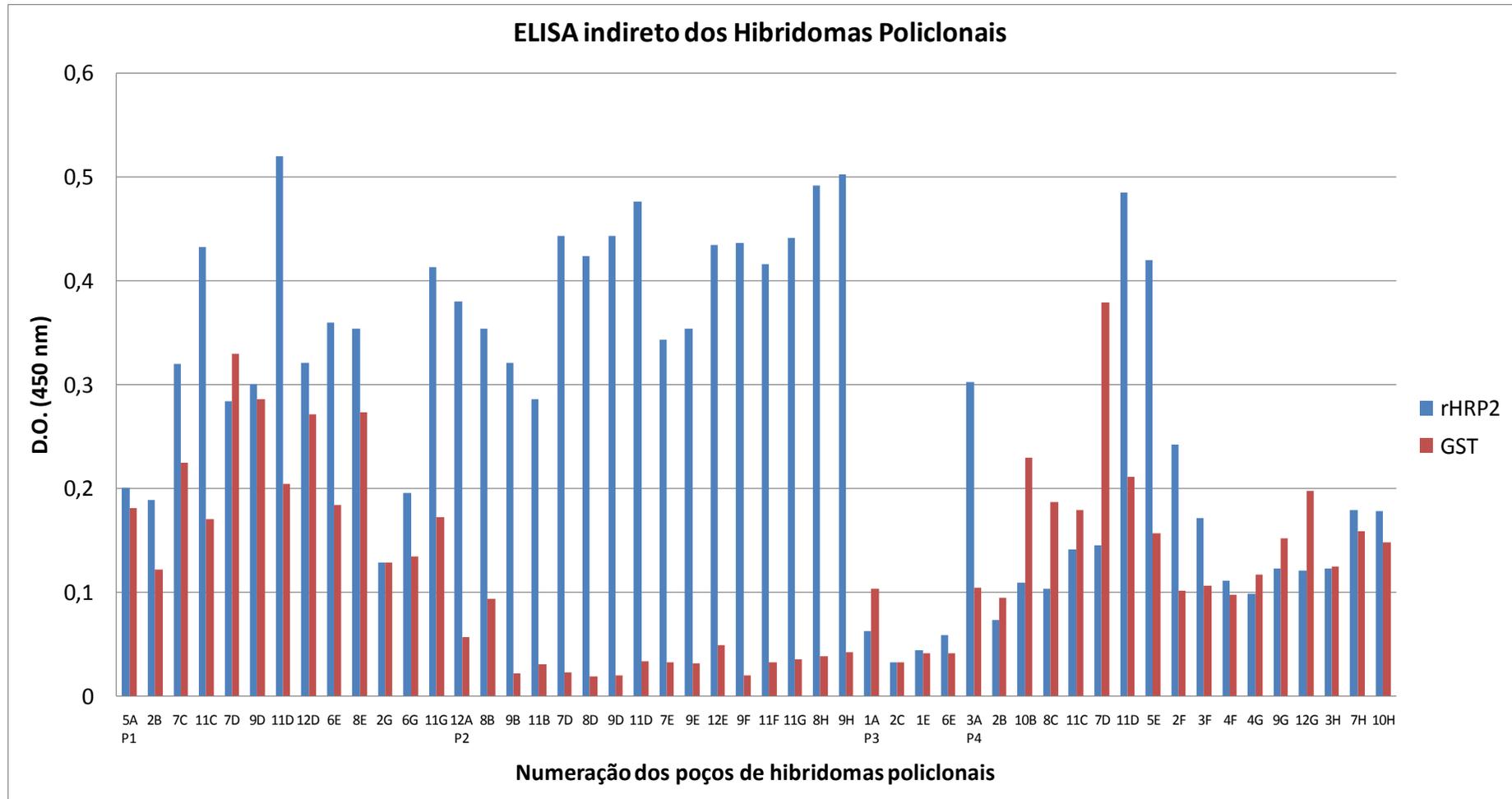


Gráfico 4 - Teste ELISA indireto dos sobrenadantes dos hibridomas. Sobrenadantes de hibridomas crescidos em quatro placas de 96 poços (denominadas “P1, P2, P3 e P4”), foram testados contra rHRP2-GST e GST. Histogramas em azul mostram a reatividade contra rHRP2; em vermelho a reatividade contra GST.

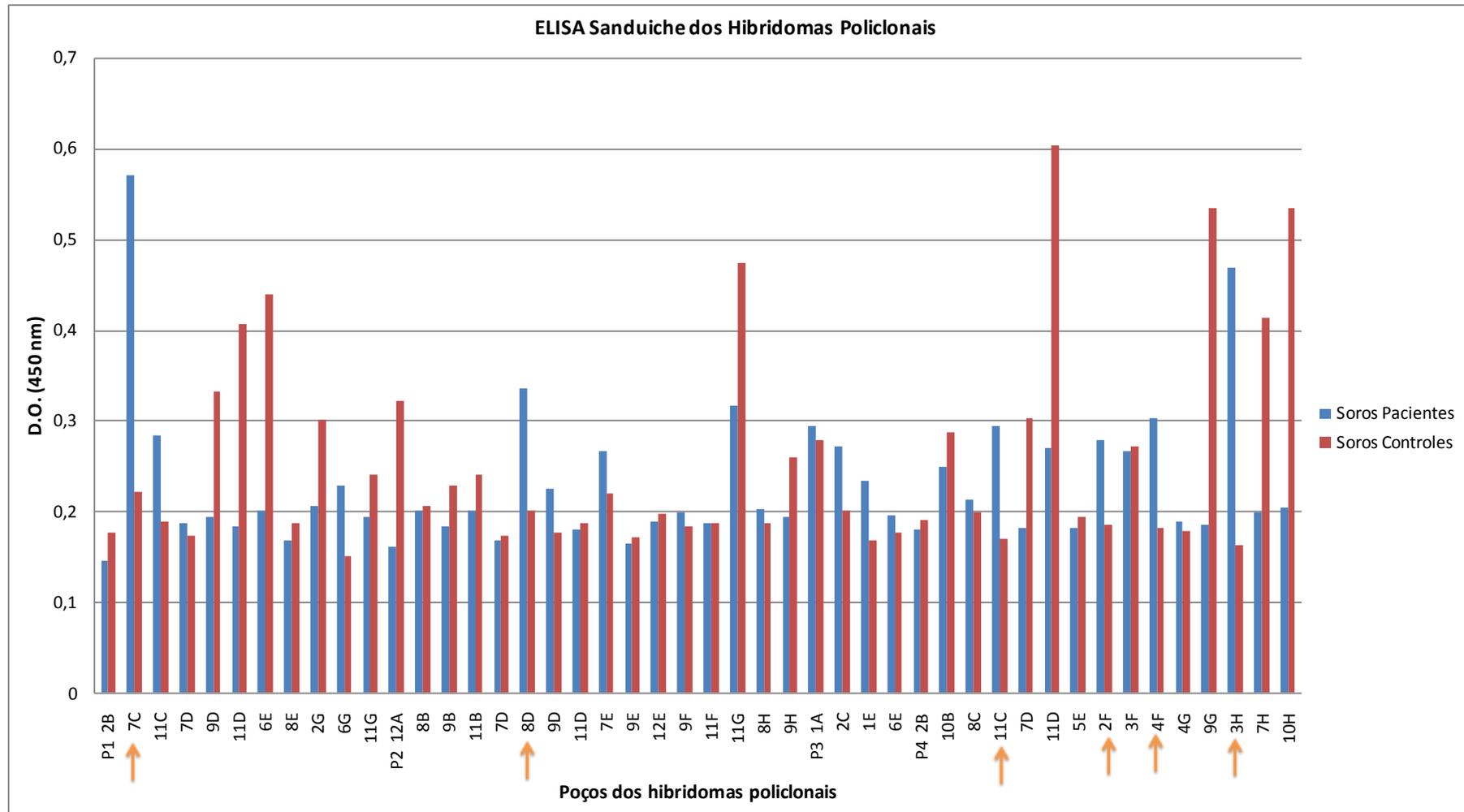


Gráfico 5 - Seleção de hibridomas anti *HRP2* nativo. ELISA sanduíche realizado com IgG policlonal anti *HRP2* de coelho, para a captura de antígeno *HRP2* nativo num “pool” de soros de pacientes com malária pelo *P. falciparum*, e sobrenadante dos hibridomas anti r*HRP2*-GST como anticorpo primário, seguido com revelação por anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Setas em laranja representam poços selecionados para diluição limitante.

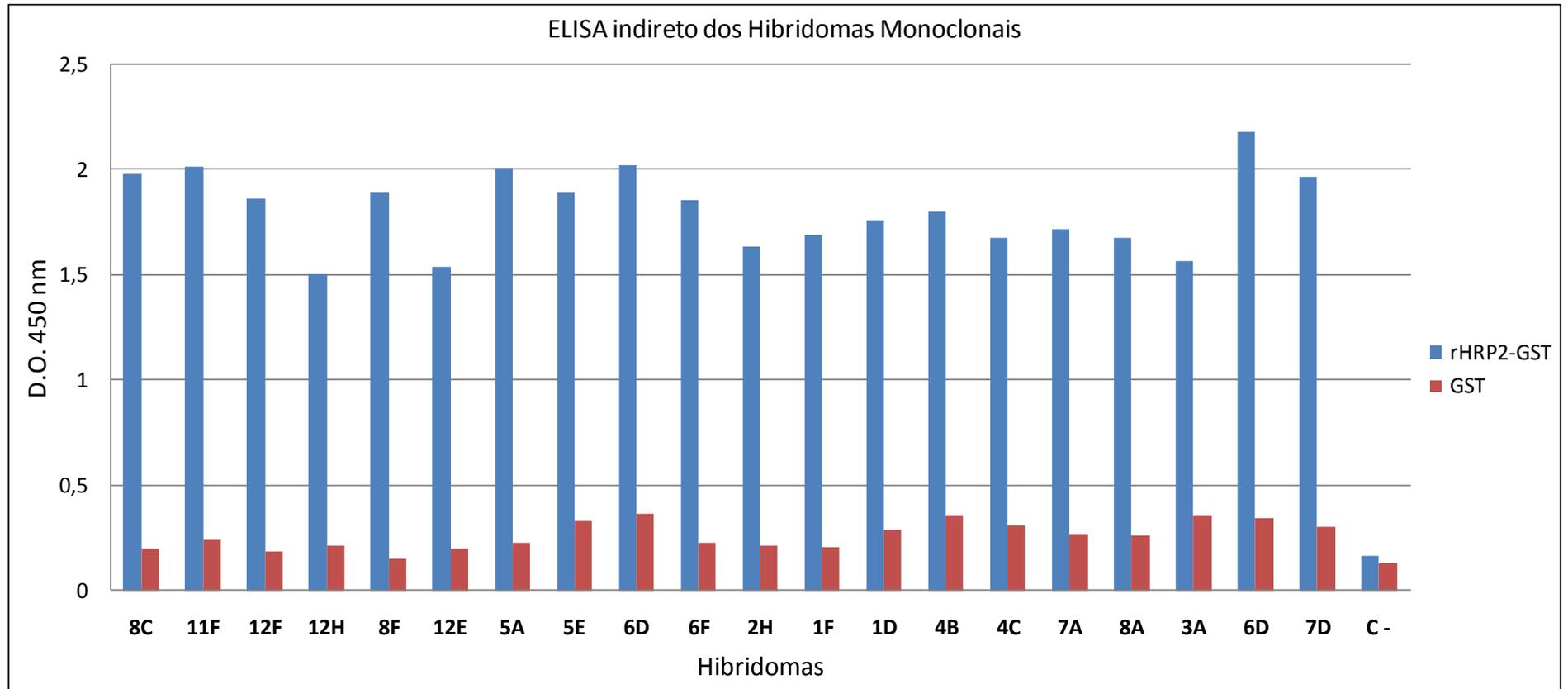


Gráfico 6 - Reatividade de 20 clones selecionados após diluição limitante. No gráfico é possível observar o resultado do sobrenadante de um dia de crescimento de vários hibridomas monoclonais. Estes secretaram quantidades de maior título de anticorpos monoclonais ($DO > 1.5$). A reatividade dos monoclonais contra GST foi semelhante ao controle negativo (soro de camundongo não imunizado).

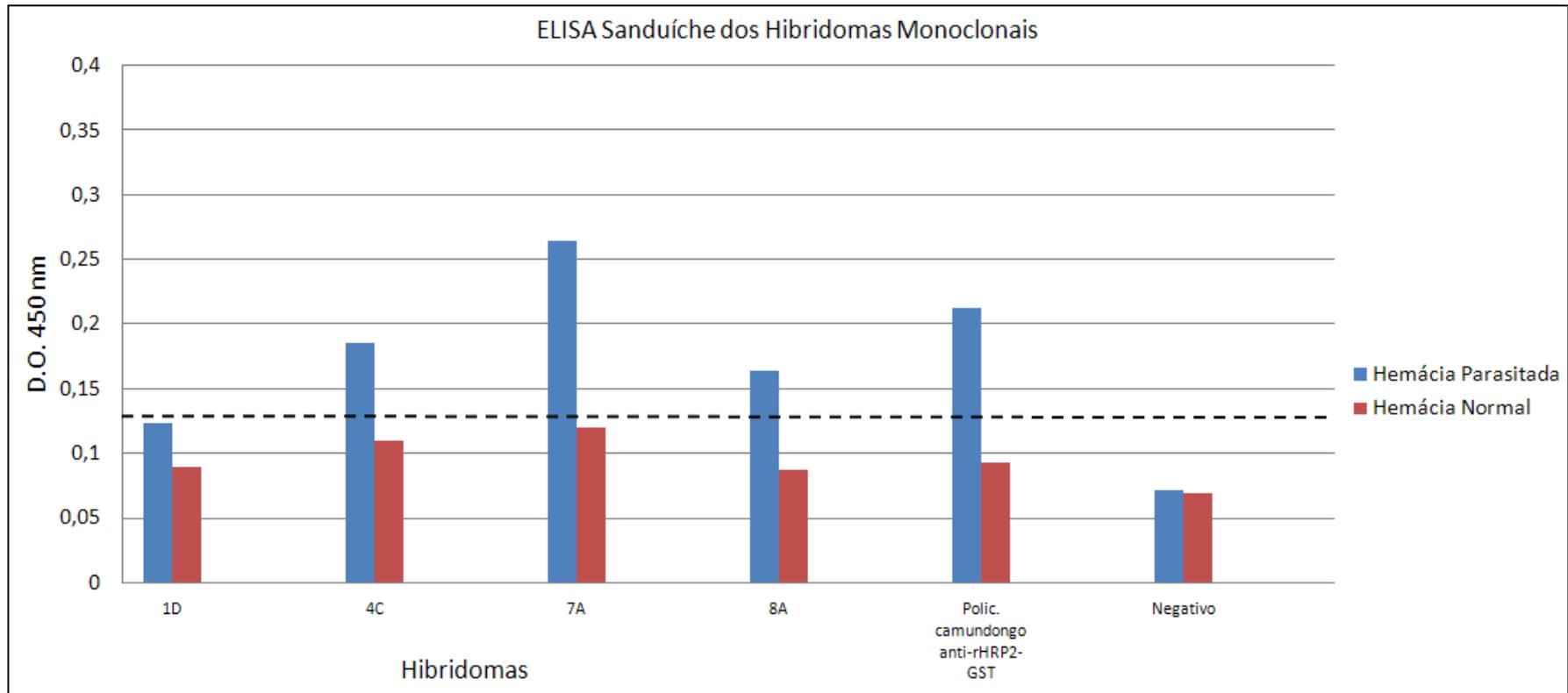


Gráfico 7 – Reatividade observada nos quatro hibridomas monoclonais (1D, 4C, 7A e 8A) capazes de reconhecer a proteína HRP2 nativa. A reatividade destes pode ser comparada com a do controle positivo, utilizando policlonal de camundongo anti-rHRP2-GST como anticorpo primário, e com o controle negativo utilizando apenas meio de cultura com soro fetal bovino. Linha pontilhada representa o cálculo “cutoff” ($\text{m\u00e9dia} + (2 \times \text{desvio padr\u00e3o})$) baseada no resultado de absorv\u00eancia da hem\u00e1cia normal.

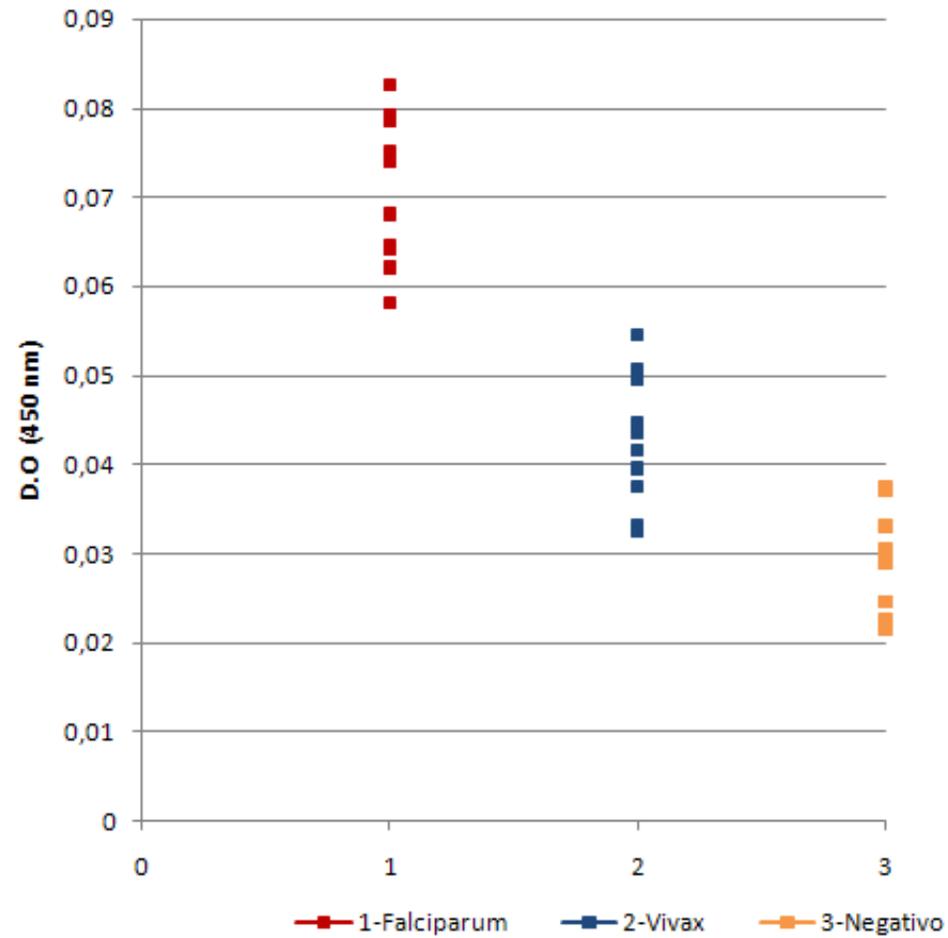


Gráfico 8 – ELISA em formato sanduíche utilizando o anticorpo monoclonal anti-HRP2 “7A” contra diferentes amostras de pacientes (com diferentes parasitemias) com *P. falciparum*, indivíduos saudáveis e amostra com *P. vivax*.

4.4 Imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti-HRP2

Como segunda prova da capacidade de reconhecimento do anticorpo monoclonal anti-HRP2 contra a proteína nativa HRP2, o mAb “7A” foi testado em ensaio de imunofluorescência com hemácias parasitadas por *P. falciparum*, cepa FCR3, e hemácias sadias, usadas como controle negativo.

Neste ensaio foi possível observar marcações no interior dos eritrócitos parasitado em diferentes fases de crescimento do *P. falciparum* (figura 16) semelhantes aos observados em estudos (HOWARD *et al.*, 1986; PARRA *et al.*, 1991) conforme mostrados anteriormente na figura 7, indicando que ocorreu o reconhecimento do anticorpo monoclonal à proteína nativa. No controle negativo com hemácias sadias nenhuma marcação semelhante foi encontrada (Figura 16, coluna 5), indicando que a observação relatada foi específica.

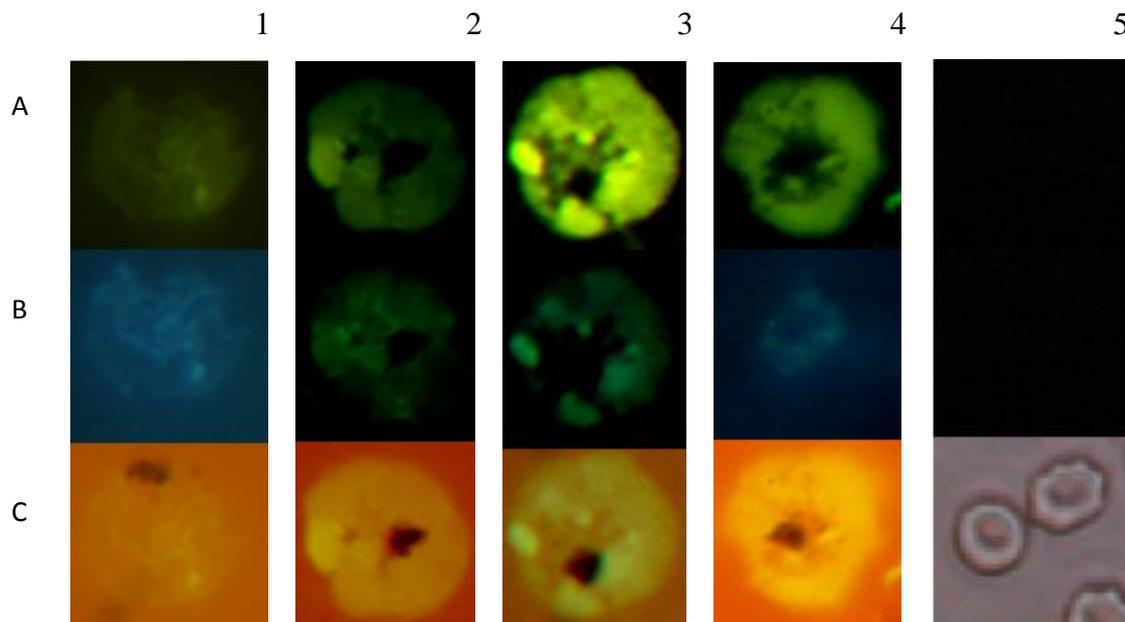


Figura 16 – Resultado da imunofluorescência realizada com o anticorpo monoclonal “7A” anti-HRP2. A: reconhecimento do anticorpo monoclonal “7A” representado pela fluorescência de cor verde; B: marcação do reagente DAPI na hemácia parasitada reconhecida pelo mAb 7A na figura “A”; C: visualização da hemácia reconhecida à luz branca, ponto mais escuro ao centro trata-se provavelmente do pigmento malárico (hemozoína). 1: Padrão de reconhecimento similar a trofozoíto jovem; 2 – Padrão de reconhecimento similar a trofozoíto maduro; 3- Padrão de reconhecimento similar a um intermediário entre trofozoíto maduro e esquizonte; 4 – Padrão de reconhecimento similar a esquizonte; 5 – Controle negativo com hemácias sadias.

Somando os resultados do ELISA sanduiche com estes obtidos na imunofluorescência, pode-se afirmar que o mAb 7A será um insumo reagente importante para o objetivo primordial deste trabalho que é o desenvolvimento de um sistema fluxo lateral que detecte o antígeno HRP2 em amostras de sangue de paciente.

Contudo é necessário informar, neste momento, que a padronização do sistema em fluxo Lateral foi realizada antes da obtenção dos monoclonais anti HRP-2. Para isso houve a necessidade da utilização de um anticorpo monoclonal com especificidade contra a molécula GST, que o laboratório já dispunha, a fim de se realizar os testes de padronização. Portanto os dados a seguir mostram os testes do sistema em fluxo lateral com a proteína GST recombinante e o anticorpo monoclonal anti-GST.

4.5 Purificação de anticorpos monoclonais anti-GST para padronização do sistema em fluxo lateral

Após os passos de purificação descritos (tópico 3.6), obtivemos um rendimento razoável em nossa amostra final, chegando a 1,77 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (500 μl) com uma amostra de sobrenadante de cultura inicial de 120 ml de sobrenadante de cultura do hibridoma secretor de anticorpo monoclonal.

Na figura 17a, pode-se observar o sobrenadante de cultura antes do processo de purificação, sendo que a banda intensa observada na altura de aproximadamente 70 kDa pertence ao meio de cultura utilizado para cultivo celular. Na figura 17b, é possível visualizar os eluatos obtidos após a purificação com coluna de afinidade de “proteína A”, sendo a banda de peso molecular de 55 kDa a cadeia pesada do anticorpo, e a de 22 kDa a cadeia leve.

Com a concentração das amostras em coluna YM-50 (Millipore) (figura 17c) obtivemos, além do óbvio aumento da concentração de proteínas, uma purificação por restrição de peso molecular. Devido ao seu alto peso molecular, de aproximadamente 150 kDa, os anticorpos

permaneciam retidos na amostra, enquanto as impurezas abaixo de 50 kDa passavam pelos poros da membrana de retenção, aumentando ainda mais a pureza de nosso produto final.

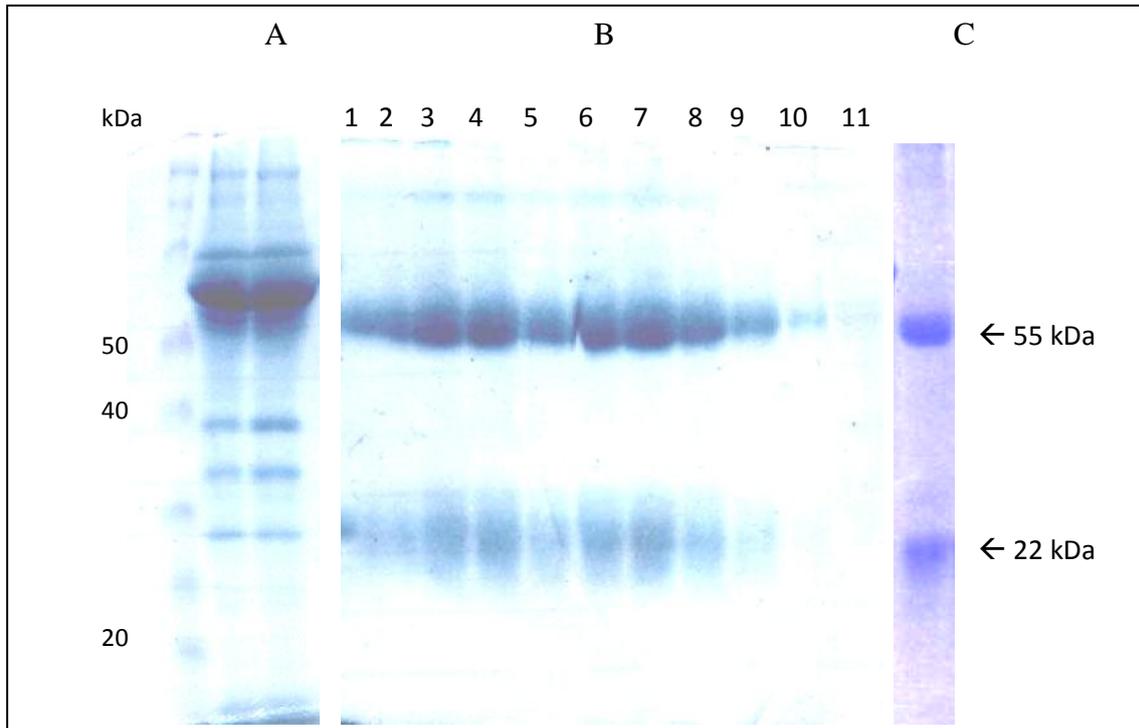


Figura 17 – Purificação do anticorpo monoclonal Anti-GST de sobrenadante de cultura. A) Sobrenadante de cultura não purificado; B) Eluição dos anticorpos (de 1 à 11) após purificação por afinidade em colunas de proteína “A”; C) Anticorpo monoclonal após concentração em coluna YM-50.

4.6 Teste do sistema em fluxo lateral competitivo com Mab-GST

Conforme mencionado acima, para desenvolver um sistema de fluxo lateral decidiu-se realizar um modelo de fluxo lateral competitivo dispondo de anticorpos monoclonais anti GST (Mab-GST) em razão dos anticorpos anti HRP2, mostrado no tópico 4.3 não terem sido obtidos neste período. Como teste utilizou-se a proteína rHRP2-GST purificada. A figura 18A mostra quatro tiras de fluxo lateral onde a seta pontilhada (parte superior) indica o local onde o anticorpo de captura anti IgG de camundongo foi fixado para servir de controle do experimento. Na posição da seta cheia (abaixo do controle anti IgG de camundongo) foi sensibilizado a proteína rHRP2-GST.

Os testes realizados com as fitas 1, 2 e 3 da Figura 18A utilizaram como fase móvel do teste, uma mistura de anti GST acoplado com ouro coloidal acrescido da proteína rHRP2-GST solúvel em concentrações crescentes 1 µl, 5 µl e 10 µl de proteína (2µg/µL), respectivamente. Na fita 4, não foi adicionado a proteína rHRP2-GST solúvel na fase móvel.

O sistema em fluxo lateral utilizando o monoclonal anti-GST revelou um resultado muito satisfatório. As amostras onde a proteína rHRP2-GST foi adicionada à fase móvel não apresentaram reconhecimento da mesma proteína na fita, enquanto na condição que não possuía a recombinante foi possível observar a formação de um “spot” positivo (Fita 4, fig. 18A) indicando que o anticorpo anti GST acoplado ao ouro continuou funcional após acoplamento e mais importante ainda que migrou corretamente através da fita cromatográfica.

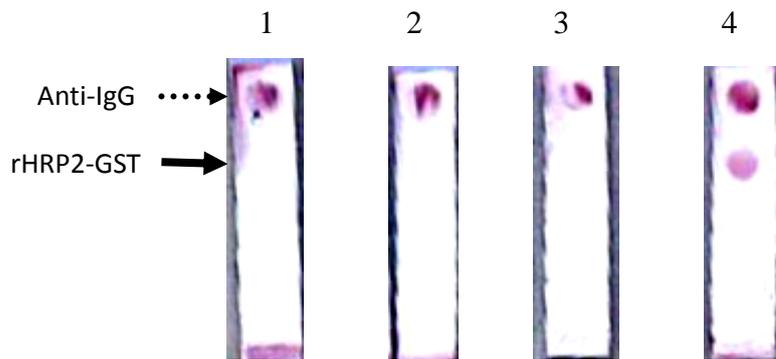
Como foi realizado um teste de fluxo lateral competitivo, ele revelou que a proteína rHRP2-GST da fase móvel das fitas 1 a 3 se ligou ao anticorpo acoplado ao ouro coloidal bloqueando o reconhecimento deste rHRP2-GST localizada na fase sólida (seta cheia) também presente na fita (figura 18A fitas 1 a 3). É preciso informar que devido a baixa resolução do “scanner” utilizado para adquirir as imagens apresentadas na figura 18A não foi possível perceber uma nuance na posição da

rHRP2-GST na fase solida da fita 1, que aparece quando se observa a fita original.

Estes resultados apresentados no fluxo lateral podem ser interpretados conforme a figura 18B. Na fita onde se aplicou a fase solida “sol. A” (anticorpo + ouro coloidal) e rHRP2-GST, o anticorpo anti GST fica bloqueado e ele é capturado somente pelo anticorpo do spot controle anti IgG de camundongo. Isto é o que se vê parcialmente na fita 1 e claramente nas fitas 2 e 3 da Figura 18 A. Enquanto que ao se aplicar apenas a “sol. A” o anticorpo monoclonal anti-GST acoplado ao ouro reagiu com a rHRP2-GST da fase solida e parte capturado pelo controle anti IgG. Este é o que se vê na fita 4 da figura 18 A.

A competitividade da rHRP2-GST na fase solúvel com a proteína na fase sólida reforça a funcionalidade dos anticorpos monoclonais anti-GST e do sistema “lateral flow” desenvolvido aqui.

A



B

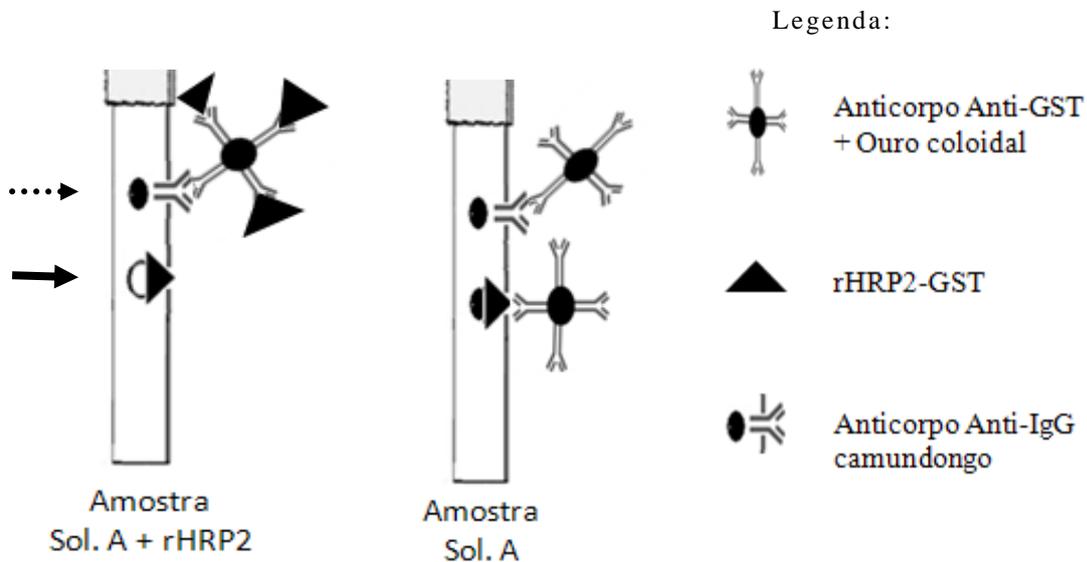


Figura 18 – Sistema em fluxo lateral utilizando monoclonal anti-GST. A) Resultado obtido após fluxo lateral competitivo utilizando anti-GST acoplado ao ouro coloidal; Fase móvel foi preparada com a Sol. A (anti GST acoplado ouro coloidal) e diferentes concentrações do antígeno rHRP2-GST: Fita 1: 2 μg de proteína, Fita 2: 10 μg de proteína e Fita 3: 20 μg de proteína na fase móvel. Fita 4 apenas anti-GST acoplado ao ouro coloidal foi colocado na fase móvel. Seta pontilhada: fase sólida contendo anti IgG de camundongo (“spot” controle). Seta cheia: fase sólida contendo a proteína HRP2-GST para avaliar a capacidade de reconhecimento e funcionabilidade do anticorpo acoplado ao ouro (“spot” teste). B) Representação esquemática do resultado obtido: quando o antígeno rHRP2-GST está presente na fase móvel (“amostra Sol. A + rHRP2”), o anti-GST (acoplado ao ouro coloidal) reconhece o mesmo antígeno na fita. Quando não há antígeno na fase móvel (“amostra sol. A”) o anti-GST reconhece o antígeno da fita. Em ambas as condições há o reconhecimento do anti-IgG da fita ao anti-GST do ouro coloidal (linha controle).

4.7 Teste do sistema em fluxo lateral em formato sanduíche com policlonal de camundongo anti-rHRP2-GST e anticorpo monoclonal anti-HRP2

Após a padronização do sistema de fluxo lateral com a proteína GST, foram realizados testes com amostras sanguíneas de pacientes com malária pelo *P. falciparum*. Os primeiros testes foram realizados com anticorpos policlonais de camundongos anti-rHRP2-GST purificados. A purificação apresentou resultado semelhante ao observado na Figura 17C. Estes anticorpos foram usados na fase sólida (fixada ao papel) e na fase móvel acoplado com ouro coloidal.

Conforme pode ser visto, é possível observar a formação de uma banda circular visível a olho nu na região denominada linha teste onde foi fixado o anti-rHRP2-GST. Esta positividade corresponde ao reconhecimento da proteína HRP2 nativa com hemácias parasitadas por *P. falciparum* (figura 19). A linha controle de todas as fitas cromatográficas continha a proteína rHRP2-GST e a formação da banda circular também foi revelada mostrando o funcionamento do sistema. E ainda duas reações controle foram realizadas utilizando a proteína recombinante rHRP2-GST na fase solúvel como controle positivo, e o tampão como controle negativo.

Importante destacar que o mesmo resultado não foi observado na condição controle (contendo apenas tampão de amostra) e com hemácias de indivíduos não infectados. Tais resultados confirmam a funcionalidade do sistema de detecção do antígeno do parasita *P. falciparum*, completando o objetivo primordial deste trabalho que é o desenvolvimento de um sistema fluxo lateral que detecte o antígeno HRP2 em amostras de sangue de paciente.

Este mesmo ensaio foi realizado com o anticorpo monoclonal “7A” anti-HRP2. Infelizmente, o mesmo resultado não foi obtido em nenhuma das condições testadas não havendo formação da banda teste, assim como da banda controle (rHRP2-GST). Maiores testes serão realizados em

trabalhos posteriores para esclarecer o motivos desta falta de reatividade o mAb testado no sistema em fluxo lateral para reforçar a expectativa positiva do mAb “7A” (ou algum dos demais obtidos) se tornar um insumo reagente desenvolvido no Brasil e especificamente no ILMD.

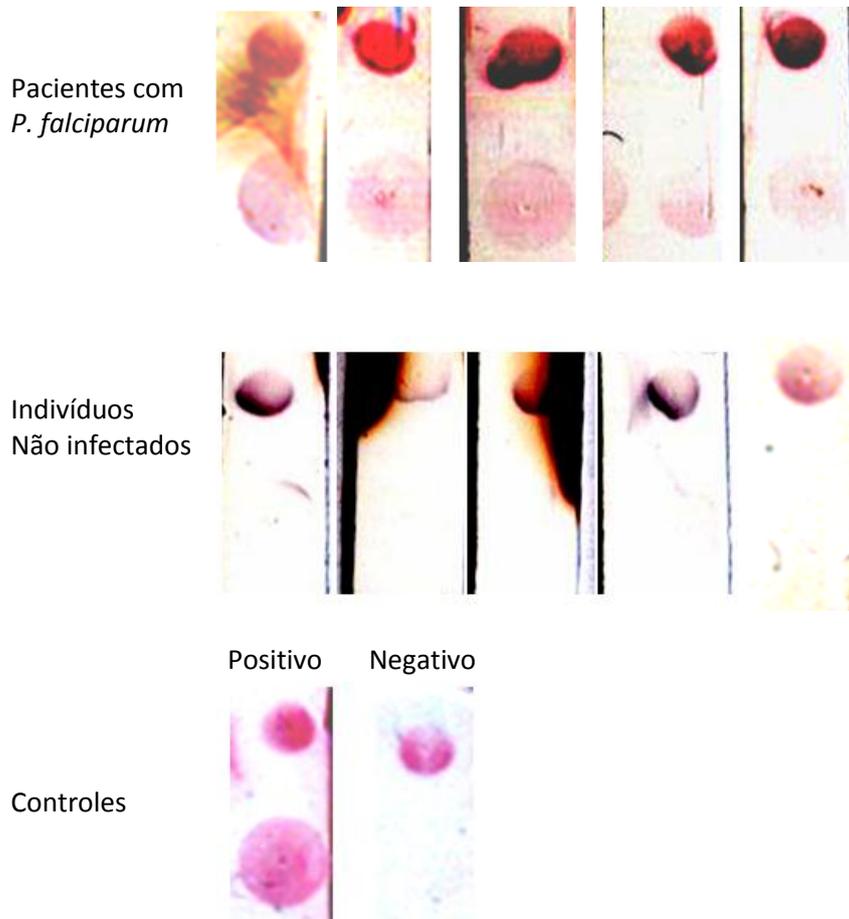


Figura 19 – Resultados obtidos utilizando anticorpos policlonais no ouro coloidal e linha teste do sistema em fluxo lateral. Condições controles apresentaram resultado esperado, visto que a que continha a rHRP2 na fase móvel (positiva) apresentou a formação de uma banda visível a olho nu na linha teste. Nas amostras sanguíneas, apenas a que continham *P. falciparum* apresentou a formação de banda, corroborando assim com o resultado esperado. Em todas as condições a linha controle do sistema em lateral flow apresentou marcação.

4.8 Determinação da estabilidade do ouro coloidal e fita imunocromatográfica

Foram realizados testes preliminares de estabilidade tanto do ouro coloidal e da fita imunocromatográfica. Foi observado que se o ouro coloidal for deixado a temperatura ambiente sem liofilização, este permanece sem perda de qualidade por até 2 dias (figura 20, col. 1). Em outra condição testada, o ouro coloidal permaneceu estável sem liofilização por até cinco dias a 4 °C, com pouca perda da intensidade de sua marcação se comparada ao controle (fita e o.c. preparados no mesmo dia), perdendo qualidade no 7° dia (figura 20, col. 2). As mesmas partículas quando liofilizadas e armazenadas a 4 °C por um mês apresentaram marcação visível, com perda pouco significativa se comparada a amostra controle (figura 20, col. 3A). O mesmo ouro liofilizado, porém, conservado a temperatura ambiente apresentou uma marcação visível após um mês de estocagem, contudo inferior a da amostra armazenada a 4 °C descrita anteriormente (figura 20, col. 3B).

Quanto as membranas de nitrocelulose, estas se mantiveram estáveis por 2 meses (período total do teste), podendo ainda ser superior a isto (figura 20, col. 4).

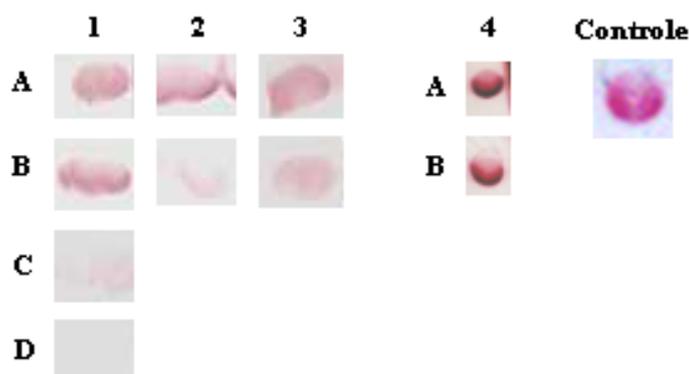


Figura 20 – Teste de estabilidade do ouro coloidal e fita imunocromatográficas preparadas. Ouro coloidal: coluna 1 e 2 correspondem ao o. c. não submetido a liofilização, conservados a temperatura ambiente e 4 °C, respectivamente. Col. 1 A, B, C e D: após 1, 2, 3 e 4 dia de preparo. Col. 2 A e B: 5 e 7 dias após preparo. Col. 3 corresponde ao o. c. submetido a liofilização conservado por um mês a 4 °C (A) e temperatura ambiente (B). Col. 4: fitas imunocromatográficas preparadas por um mês (A) e dois meses (B) testadas com o. c. preparado no dia. Controle: ouro coloidal acoplado ao anticorpo e fita imunoc. preparadas no mesmo dia.

5 - Discussão

A descoberta da tecnologia do hibridoma utilizada para a produção de anticorpos monoclonais (mAbs) por Köhler e Milstein (1975) tem sido utilizada como ferramenta fundamental na investigação da estrutura antigênica, uma vez que mAbs se ligam especificamente a uma determinada área da proteína denominada epítipo (TANJONI, 2002, p. 20). Neste estudo, a utilização destas macromoléculas é essencial para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido para malária.

Para a obtenção dos Mabs, nossa equipe desenvolveu em trabalhos anteriores uma proteína recombinante da HRP2 (rHRP2-GST). Esta proteína foi reconhecida por “kits” de diagnóstico de malária causada por *Plasmodium falciparum* Cel-lab (Australia) e Hexagon, kit de fluxo lateral da Alemanha (FILHO, 2005). Estes testes revelaram que a proteína rHRP2-GST mesmo sendo recombinante continha epítopos comuns a HRP-2 nativa do *Plasmodium falciparum*, representando uma característica importante e motivando a continuidade do trabalho com a possibilidade de obter anticorpos dirigidos contra estes mesmos epítopos.

Acrescentando, a sorologia com IgG policlonais de coelhos e camundongos anti HRP2 reconheceram o antígeno HRP-2 nativo em altos níveis pelo sistema de ELISA sanduíche, o que confirmou as nossas expectativas e incentivou a continuidade da pesquisa (SANTOS, 2006).

Esta proteína é facilmente purificada do sobrenadante do lisado bacteriano por cromatografia de afinidade, dado a sua alta solubilidade. Após a purificação, pode-se observar em gel de SDS-PAGE (figura 15) a presença de bandas de tamanho inferior a da proteína alvo. Como estas proteínas foram reconhecidas por anticorpos monoclonais anti-GST (FERREIRA, 2006) em ensaios por “western blot”, supomos que estes fragmentos sejam produtos da clivagem sofrida pela proteína durante o processo de purificação.

Logo, foram realizadas induções da rHRP2-GST em diferentes condições, buscando a que expressasse uma concentração de proteína suficiente para o desenvolvimento dos trabalhos. Esta foi obtida utilizando 10 g/L de Lactose, por 3 horas, a 37 °C (figura 15 a, canaletas

“6-9”). Pelo que pode ser observado há uma grande ação proteolítica durante longos períodos de indução (16 horas, figura 15 B e D) no interior da bactéria, que reduziu ao mesmo tempo a concentração da proteína alvo e das clivagens produzidas. Visto que o resultado obtido após 3 horas de indução foram bastante similares entre os indutores (figura 15 A e C, canaletas 6-9), foi escolhido o de menor custo financeiro para o desenvolvimento da pesquisa, a lactose.

Com a rHRP2-GST validada, foi possível imunizá-la em camundongos, visando a obtenção de animais que possuíssem altos títulos de anticorpos IgG anti-HRP2-GST em sua corrente sanguínea. Este é um indício de que haveria grande número de células produtoras destes anticorpos em seus órgãos do sistema imunológico, como por exemplo, o baço. Podemos observar em nossos resultados que após a primeira imunização, não há um nível significativo de IgG contra a proteína, diferente dos resultados obtidos após a terceira dose no animal, quando os títulos destes anticorpos foram altíssimos. Estas observações se devem a existência de algumas características das respostas imunológicas adquiridas. Após o primeiro contato com o antígeno, a resposta é lenta havendo uma produção relativamente baixa de imunoglobulinas, sendo a IgM a principal subclasse produzida (por esta razão há uma baixa detecção de IgG nos ELISA) (MADIGAN *et al.*, 2004). No segundo contato, a resposta é mais rápida e há a produção de altos títulos de IgG contra o antígeno imunizado. Ocorre, então, neste ponto a mudança do isótipo (cadeia pesada) dos anticorpos, e logo, a alteração de sua capacidade efetora de ativação do complemento (IgM) para fagocitose dependente do receptor Fc, ativação do complemento, dentre outras (IgG). Este processo é exacerbado mais ainda na terceira imunização (ABBAS E LICHTMAN, 2005) (gráfico 3).

A grande capacidade imunogênica da rHRP2-GST se deve também a sua cauda de glutathione-S-transferase (GST). Este cauda foi adicionada a proteína para facilitar sua purificação, tratando-se de uma proteína de 26 kDa comum entre os eucariotos, sendo o gene do plasmídeo originário do helminto *Schistosoma japonicum*. A principal vantagem deste sistema

é o alto nível de produção da proteína recombinante fusionada (frequentemente >10 a 50 mg/litro de cultura de *E. coli*) e a facilidade dos métodos de purificação para tanto isolamento inicial e posterior separação da proteína estudada e a cauda GST (HARPER & SPEICHER, 1997). Estudos mostraram que esta enzima é imunogênica e que pode aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes expressas no citoplasma de *E. coli* (SMITH & JOHNSON, 1988).

Enquanto os testes para a obtenção de anticorpos monoclonais eram desenvolvidos, simultaneamente foram realizados testes para padronização do sistema em fluxo lateral. Para tanto, foi cultivado um hibridoma produtor de anticorpos anti-GST produzidos em trabalhos anteriores de nossa equipe. O sobrenadante deste foi purificado através de uma junção de técnicas que visou à obtenção de um produto mais concentrado e livre de impurezas, sendo elas precipitação com sulfato de amônia (seguida de uma diálise), purificação em coluna de afinidade de “proteína A”, e concentração protéica utilizando a coluna YM-50 (Millipore).

Devido ao grande volume de sobrenadante de cultura obtido ao longo de alguns dias de cultivo, fez-se necessário concentrar estes anticorpos em um volume menor antes de passá-los pela coluna de afinidade, para evitar assim a perda prematura deste sistema. A precipitação com sulfato de amônia foi utilizada neste intuito, sendo esta técnica capaz de concentrar 10 vezes a amostra, e a diálise que se segue após a precipitação retira, além do sal, pequenos contaminantes presentes no sobrenadante de cultura. Porém, contaminantes de alto peso molecular permanecem, como os observados em gel SDS-PAGE (figura 17). Por tal motivo foi utilizada a técnica de purificação em coluna de “proteína A”. Esta proteína é encontrada na natureza na superfície da bactéria *Staphylococcus aureus*, possuindo alta capacidade de ligação com a porção Fc de anticorpos IgG de alguns organismos. Aproveitando esta capacidade, a coluna de “proteína A” retém os anticorpos deixando os contaminantes da amostra passarem por ela durante a lavagem (HARLOW & LANE, 1988). É uma técnica simples, relativamente

rápida, porém onerosa. Os eluatos obtidos nesta purificação foram passados pela coluna YM-50 (Millipore). Este procedimento proporcionou além do aumento da concentração de proteínas, uma restrição de peso molecular (devido ao alto peso molecular dos anticorpos nativo de aproximadamente 150 kDa), visto que a coluna não retém moléculas menores que 50 kDa, aumentando assim ainda mais a pureza de nosso produto final. Este procedimento foi seguido de mais uma diálise em Na_2HPO_4 tornando assim o produto final ideal para acoplamento em ouro coloidal, já que os únicos radicais amina e carboxila presentes teoricamente na amostra são os presentes nos anticorpos.

Com os anticorpos monoclonais anti-GST purificados, foi possível iniciar os testes para montagem do sistema em fluxo lateral. Devido ao número pobre de publicações ou técnicas disponíveis sobre o assunto nos meios de pesquisa, os testes para tal procedimento foram repetidos exaustivamente seguindo algumas referências (MIKAWA, 2006; HERMANSON, 1996; TECHNOTE#101, 2007; WONG & TSE, 2009; RASOOLY & HEROLD, 2009) até a obtenção dos resultados atuais.

Logo, a metodologia apresentada representa o resultado de mais de 20 tentativas, onde a concentração e o método de preparo de cada item formador do teste foram variados (dados não apresentados). A metodologia empregada para o acoplamento do anticorpo ao marcador foi a de adsorção passiva, tipicamente obtida com ouro coloidal (WONG & TSE, 2009).

Nos resultados aqui mostrados (figura 18), ficou claro que a presença da rHRP2-GST na fase móvel foi responsável pela inibição do reconhecimento da mesma proteína recombinante presente na membrana de nitrocelulose. Este teste validou o sistema em fluxo lateral competitivo e deixou o projeto sob espera dos anticorpos monoclonais anti-HRP2 para a montagem de um sistema em sanduíche.

Ainda no período anterior a obtenção dos anticorpos monoclonais anti-HRP2, foi realizado um teste do sistema em fluxo lateral utilizando anticorpos policlonais de camundongo anti-rHRP2-GST, tanto conjugado

ao ouro coloidal quanto imobilizado na membrana de nitrocelulose. Tal sistema foi capaz de detectar com especificidade a proteína HRP2 nativa em hemácias de pacientes infectados com *P. falciparum*, cumprindo assim com o objetivo central deste trabalho que foi o desenvolvimento ou padronização de um sistema com esta capacidade (figura 19).

Após uma série de tentativas, os anticorpos monoclonais foram obtidos com sucesso. Logo, apenas 4 hibridomas monoclonais apresentaram alguma reatividade contra a proteína nativa HRP2. Os demais hibridomas ou não reagiram contra a proteína nativa ou se mostraram instáveis após dias de culturas. A instabilidade dos clones caracteriza-se pela gradativa queda da detecção de anticorpos no sobrenadante de cultura no decorrer de dias. Isto pode ocorrer, porque após a fusão, a célula apresenta um número de cromossomos alterado, o que faz com que a segregação dos mesmos não ocorra normalmente durante a mitose, podendo haver perdas aleatórias de cromossomos. Se um dos cromossomos responsáveis cessarem, o resultado fenotípico disto é a diminuição no título de anticorpos (HARLOW & LANE, 1988).

Um bom exemplo do quanto pode ser difícil a obtenção de um clone com potencial para ser utilizado no teste de diagnóstico rápido foi vivenciado por nossa equipe. Foi realizado todo o processo para a produção de uma proteína recombinante do gene da lactato desidrogenase de *Plasmodium vivax* (PvLDH), que incluem as exaustivas etapas de clonagem, expressão e purificação (nesta o trabalho foi ainda mais arduo visto que a proteína expressada se encontrava na forma de corpos de inclusão). Após, foram desenvolvidas os passos para a produção de um anticorpo monoclonal. Este foi obtido, porém nos passos finais para validar sua utilização no kit foi observado que tais anticorpos reagem também com soros de pessoas normais (visto que a LDH também pode ser encontrada em humanos), inviabilizando o uso destas moléculas no desenvolvimento do estudo (dados não mostrados).

As imunizações com rHRP2 fusionadas a GST também tornaram-se um problema na produção dos anticorpos monoclonais, visto que parte dos clones obtidos possuíam grande reatividade para a cauda proteica

(gráfico 4). Este foi apenas um dos obstáculos que o estudo ultrapassou para chegar ao “status” atual. Contaminações por leveduras na cultura, dificuldades no desenvolvimento da técnica, infra-estrutura em constante mudança são outros exemplos.

Além disto, as dificuldades comuns a projetos que visam à obtenção de anticorpos monoclonais também foram experimentadas, tais como o reconhecimento da proteína nativa pelos anticorpos monoclonais. Isto ocorre devido ao fato da bactéria não enovelar a proteína recombinante da mesma forma que o eucarioto *P. falciparum*, o que torna mais provável a obtenção de anticorpos monoclonais que reconheçam epítopos lineares superficiais da proteína nativa, e mais raro anticorpos contra epítopos conformacionais (WONG & TSE, 2009).

Com a obtenção dos resultados positivos nos teste em fluxo lateral utilizando anticorpos policlonais, surgiu uma grande esperança que o mesmo se repetisse com os anticorpos monoclonais. Porém, antes deste ensaio ser realizado, a equipe achou necessário obter novas confirmações quanto a capacidade de reconhecimento dos anticorpos obtidos à proteína nativa HRP2. Para tanto, foi realizado outro ELISA em formato sanduíche, porém com hemácias de dez pacientes com *P. falciparum* e dez amostras de indivíduos saudáveis, utilizando como anticorpo primário apenas o anticorpo monoclonal “7A”, visto que este foi o que melhor reagiu no primeiro ELISA sanduíche realizado (gráfico 7 e 8).

Neste, podemos observar que a densidade óptica obtidas em todas as amostras contendo o patógeno foram superiores ao controle negativo, não apresentaram, porém, uma D.O elevada. Outros ensaios semelhantes foram realizados (dados não mostrados) procurando uma elevação destes números, contudo estes foram similares aos apresentados. A baixa absorvância observada também foi relatada em trabalhos anteriores desenvolvidos por nossa equipe (SANTOS, 2006), sendo estes resultados mostrados no tópico 1.7 neste documento. Uma possível explicação para estas observações seja a reduzida concentração de antígenos nas amostras testadas. Santos (2006) relatou ainda que ao trabalhar com amostras de soro de pacientes que sofreram congelamento e

descongelamento estas apresentaram nos ELISA sempre uma D.O. inferior quando comparadas com amostras frescas. O mesmo pode estar ocorrendo nos resultados aqui apresentados com a utilização de hemácias parasitadas de paciente como fonte de antígeno que foram congeladas e descongeladas. Kifude e colaboradores (2008) observaram o mesmo fenômeno associando isto a uma instabilidade da HRP2 após ciclos de congelamento e descongelamento.

Ainda buscando confirmar se o anticorpo monoclonal “7A” era realmente capaz de reconhecer a HRP2 nativa de *P. falciparum*, foram realizados ensaios de imunofluorescência como segunda prova desta reatividade (figura 16). Neste, ficou claro a capacidade de reconhecimento deste anticorpo frente ao antígeno nativo. A marcação obtida neste ensaio foi similar a observada em outros trabalho (HOWARD *et al.*, 1986; PARRA *et al.*, 1991) (figura 7), apresentando um forte reconhecimento no estágio de trofozoíto maduro e esquizonte eritrocitário do *P. falciparum*. Além disto, foram observados reconhecimento mais fracos, porém presentes, nos estágios de trofozoíto jovem e maduro. Este ensaio nos serviu como prova cabal da qualidade do produto produzido aqui.

Com as confirmações descritas obtidas, realizamos o teste em fluxo lateral utilizando o mAb 7A anti-HRP2. Porém, neste não foi observada reatividade similar a obtida com os anticorpos policlonais, não havendo a formação de banda em nenhuma das condições testadas. Novos testes serão realizados, em trabalhos posteriores, visando à padronização do uso destes anticorpos monoclonais em um sistema de fluxo lateral. A metodologia aqui desenvolvida servirá como molde para estes futuros testes

Além disto, foram realizados testes preliminares de estabilidade tanto do ouro coloidal acoplado aos anticorpos policlonais e da membrana de nitrocelulose. Neste ensaio foram obtidos resultados satisfatórios demonstrando assim que possivelmente, em um ambiente de produção controlado, este sistema em fluxo lateral poderia permanecer estável por um tempo satisfatório para sua comercialização. Porém,

maiores ensaios serão realizados em trabalhos posteriores buscando sanar dúvidas remanescentes a este assunto.

Em razão dos resultados promissores obtidos aqui, o desenvolvimento deste teste para diagnóstico rápido da malária já se tornou o ponto de partida para produção, em um futuro a curto prazo, de kits para detecção de outras doenças. Isto contribuirá para o desenvolvimento tecnológico regional e que possibilitará a formação de um grupo forte e consolidado na área.

6 - Conclusão

Partindo dos resultados obtidos, conclui-se que o anticorpo monoclonal “7A” anti-HRP2 é capaz de reconhecer a proteína nativa em amostras de pacientes e cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum*.

Outros três anticorpos monoclonais apresentaram reatividade contra HRP2 nativa em um ELISA em formato sanduíche, porem mais testes devem ser realizados para confirmar sua reatividade

O sistema em fluxo lateral padronizado aqui apresentou resultados satisfatórios utilizando anticorpos policlonais anti-rHRP2-GST, reconhecendo amostras contendo o *P. falciparum* e apresentando resultado negativo em amostras contendo hemácias normais.

As técnicas de produção de anticorpos monoclonais e sistema em fluxo lateral, padronizadas aqui, podem ser ajustadas para utilização em outros trabalhos visando à detecção de uma diversidade de doenças.

7 - Referências bibliográficas

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. **Imunologia celular e molecular**. 4^a ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

BARATA, R. C. B. Malaria Epidemiology in Brazil. Collaborative course on infection diseases, Harvard School of Public health. January, 2008. Disponível em: <[www.drclas.harvard.edu/.../ Lecture_7_Malaria_Barata_jan2008.ppt](http://www.drclas.harvard.edu/.../Lecture_7_Malaria_Barata_jan2008.ppt)>, acesso: 28 de novembro de 2009.

BARKAN, D.; GINSBURG, H.; GOLENSER, J. Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in plasmodium-infected mice. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 640-653, 2000.

BELL, D.; WONGRICHANALAI, C.; BARWELL, J. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved?. **Nature**, vol 4, 2006.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. Ministério da saúde (Brasil). Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Pesquisa_Saude/grafico34.jpg>, acesso em: 20 de Janeiro de 2010. il. color.

BRUCE-CHAWTT, L J. IN: **Essential Malariology** 2 ed., Willian Heissemann Medical Books, London, 1985.

CARTER, R.; MENDIS, K. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 4, p. 564-594, 2002,

CASALS-PASCUAL, C.; ROBERTS, D; WEATHERALL, D; MILLER, L; BARUCH, D; MARSH, K.; DOUMBO O. Malaria and the Red Cell. **Hematology**, v. 1, n. 35, 2002.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Malaria. Seção: Diagnostic. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.htm>, acesso em: 28 de Novembro de 2007.

CDC –Centers for disease control and prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm> Acesso em: 10 de fevereiro de 2010. il. color.

COOK, GC. Manson's Tropical disease. **Saunders**, ed. 20^a, 1996.

CHIARELLA, P.; FAZIO, V. Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughout production. **Biotechnol Lett**, v. 30, p. 1303-1310, 2008.

CHOTIVANICH K, SILAMUT K, DAY NPJ. Laboratory diagnosis of malaria infection-a short review of methods. **Aust J Med Sci**, v. 27, p. 11-15, 2006.

DOBSON, M. J. The Malariology Centenary Parasitology. **Parassitologia**, v. 41, p. 21-32, 1999.

DUFFY, P.; FRIED, M. Malaria: New diagnostics for an old problem. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 73, n. 3, p. 482-483, 2005.

EIKEN GENOME SITE. About LAMP method. Disponível em: <<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>>, acesso: 10 de agosto de 2010.

ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA ON-LINE. Monoclonal antibody: artificial production. Disponível em: <<http://www.britannica.com/ebc/art/print?id=17648&articleTypeId=1>>, acesso: 28 do novembro de 2007 il. color.

FAIRHURST, R. M.; WELLEMS, T. Modulation of malaria virulence by determinants of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 display. **Current opinion in hematology**, v. 13, p. 124-130, 2006.

FERREIRA, QUÉSSIA DEBORA MAMANI. Produção de anticorpos monoclonais contra a proteína rica em histidina 2 de *Plasmodium falciparum* (PfHRP2). **Universidade Federal de Rondônia**, UNIR, Brasil, 2006.

FILHO, JAIME GAZOLA. Clonagem e expressão da proteína HRP2. **Universidade Federal de Rondônia**, UNIR, Brasil, 2005.

GELIFESCIENCES. Mapa do plasmídeo pGEX. Disponível em: <<http://www.gelifesciences.com/APTRIX/upp01077.nsf/Content/Product?OpenDocument&parentid=366157&moduleid=38859&zone=Proteomics>>, acesso: 16 de agosto de 2010.

GREENWOOD, B.; TARGETT, G. Do we still need a malaria vaccine?. **Parasite immunology**, v. 31, p. 582-586, 2009.

GREENWOOD B, MUTABINGWA T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, p. 670–672, PMID 11832954, 2002.

GROVER-KOPEC E, KAWANO M, KLAVER R, BLUMENTHAL B, CECCATO P, CONNOR S. An online operational rainfall-monitoring resource for epidemic malaria early warning systems in Africa. **Malar J**, v. 4, n. 6, PMID 15663795, 2005.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies, A Laboratory Manual. **Cold Spring Laboratory**, p. 615-619, 1988.

HARPER, S.; SPEICHER, D. Expression and purification of GST fusion proteins. **Current protocols in protein science**, Jonh Wiley & Sons, Ins., 6.6.1-6.6.21, 1997.

HERMANSON, GREG T. Bioconjugation techniques. **Academic Press**, 1996.

HOWARD, R. J.; UNI, S.; AIKAWA, M.; ALEY, S. B.; LEECH, J. H.; LEW, A. M.; WELLEMS, T. E.; RENER, J.; TAYLOR, D. W. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRPII) from *Plasmodium falciparum*- infected erythrocytes. **The Journal of cell biology**, v. 103, 1986.

INOUE, H., NOJIMA, H., & OKYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, p. 23-28; 1990.

KIFUDE, M. C.; RAJASEKARIAH, H. G.; SULLIVAN, D. J.; STEWART, V. A.; ANGOW, E.; MARTIN, S. K.; DIGGS, C. L.; WAITUMBI, J. N. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in blood, plasma, and serum. **Clinical and vaccine immunology**, v. 15, n. 6, 2008.

KIM, S.; PARK, J. Development of a test strip reader for a lateral flow membrane-based immunochromatographic assay. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 9, p. 127-131, 2004.

LIMA, A. S. S.; CARNEIRO, L. A. D. Principais Espécies de *Anopheles s.p.* Vetores da Malária no Brasil. (Díptera: Culicidae). **Programa de graduação em Ecologia, Universidade Veiga de Almeida**, RJ, Brasil, 2005.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. **Prentice Hall**, São Paulo, 2004.

MEDEIROS, M. Z. Reagentes para diagnóstico: estratégias para a produção e desenvolvimento em bio-manguinhos. **Escola nacional de saúde pública Sergio Arouca / Fundação Oswaldo Cruz**, Mestrado profissional em gestão de C&T em saúde. Rio de Janeiro, 2004.

MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K & DOUMBO OK. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673–679, 2002.

MIKAWA, ANGELA YUMICO. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C. **Universidade Estadual Paulista**, Araraquara, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Guia para profissionais de saúde sobre prevenção da malária em viajantes. Brasília, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Guia pratica de tratamento da malária no Brasil, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21914>, acesso: 27 de janeiro de 2010a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf> acesso: 27 de Janeiro de 2010b.

MISHRA SK; MOHANTY S; MOHANTY A; DAS BS. Management of severe and complicated malaria. **Journal of postgraduate medicine**, v. 52, 2006.

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. **Clinical microbiology reviews**, p. 66-78, 2002.

MOTA MM, PRADEL G, VANDERBERG JP, HAFALLA JC, FREVERT U, NUSSENZWEIG RS, NUSSENZWEIG V & RODRIGUEZ A. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, p. 141–144, 2001.

MURRAY, C.; GASSER, R.; MAGILL, A.; MILLER, R. Update on rapid diagnostic testing for Malaria. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 1, p. 97-110, 2008.

OLIVEIRA, M. R. F. Análise de custo-efetividade de teste rápido para o diagnóstico de casos novos de malária em doze municípios endêmicos do Estado do Pará. **Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.

O'FARRELL, B. Evolution in lateral flow – Based immunoassay systems. In.: Wong, R.C.; Tse, H.Y. Lateral flow immunoassay, **Human press**, New York, 2009.

O'MEARA, W. P.; LANG, T. Malaria vaccine Trial endpoints – bridging the gaps between Trial design, public health and the next generation of vaccines. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 574-581, 2009.

PARIS, D.; IMWONG, M.; FAIZ, A.; HASAN, M.; YUNUS, E.; SILAMUT, K.; LEE, S.; DAY, N.; DONDORP, A. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77 (5), p. 972-976, 2007.

PARRA, M.; EVANS, C.; TAYLOR, D. Identification of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the plasma of humans with malaria. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 8, p. 1629-1634, 1991.

PLAMODB - PLASMODIUM DATA BASE. Disponível em: <http://plasmodb.org/plasmo/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&project_id=PlasmoDB&primary_key=MAL7P1.231>, acesso em: 23 de Janeiro de 2010.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; AMERONGEN, A. V. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Anal Bioanal Chem**, v. 393, n. 569-582, 2009.

PORTAL DA SAÚDE. SIVEP. A malária no Brasil. Disponível em <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf>, acesso em: 28 de novembro de 2007.

PREFEITURA DE PORTO VELHO. História de Rondônia. Disponível em: (http://www.portovelho.ro.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=51&Itemid=73). Acesso em 28 de novembro de 2007.

RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. Methods in molecular biology: biosensors and biodetection, **Humana Press**, v. 504, 2009.

ROCK, E.P.; MARSH, K.; SAUL, S. J.; WELLEMS, T.E.; TAYLOR, D.W.; MALOY, W.L.; HOWARD, R.J. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidina-rich proteins HRP1, HRP2 and HRP3 in malaria diagnosis of diverse origin. **Parasitology**, v. 95, p. 209-227, 1987.

SAMBROOK, J., FRITSCH, EF, AND MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Ed. 2, v. 1, 2 e 3, 1989.

SANTOS, ALCIONE OLIVEIRA. Produção de anticorpos policlonais anti HRP-2gst para desenvolvimento de kit diagnóstico de malária *falciparum*. **Faculdade São Lucas**, 2006.

SHAPIRO HM, MANDY F. Cytometry in malaria: moving beyond Giemsa. **Cytometry A**, v. 71, p. 643-645, 2007.

SHARMA, S.; PATHAK, S. Malaria vaccine: a current perspective. **J. Vector Borne Dis**, v. 45, p. 1-20, 2008.

SHE RC, RAWLINS ML, MOHL R, PERKINS SL, HILL HR, LITWIN CM. Comparison of immunofluorescence antibody testing and two enzyme immunoassays in the serologic diagnosis of malaria. **J Travel Med**, v. 14, p. 105-111, 2007.

SMITH DB, JOHNSON KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione-S-transferase. **Gene**, v. 67, p. 31-40, 1988.

SULLIVAN, D. J.; KRISHNA, S. Malaria – Drugs, disease and post-genomic biology. **Springer**, p. 301, 2005.

TALMAN A, DOMARLE O, MCKENZIE F, ARIEY F, ROBERT V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. **Malar J**, v. 3, p. 24, PMID 15253774, 2004.

TANAKA, Ryo; YUHI, Teruko; NAGATANI, Naoki; ENDO, Tatsuro; KERMAN, Kagan; TAKAMURA, Yuzuru; TAMIYA, Eiichi. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. **Anal Bioanal Chem**, 2006.

TANGPUKDEE, N.; DUANGDEE, C.; WILAIRATANA, P; KRUDSOOD, S. Malaria diagnosis: a brief review. **Korean J Parasitol.**, v. 47, n. 2, p. 93-102, 2009.

TANJONI , ISABELLE. Estudo da relação entre estrutura e função da jararagina utilizando anticorpos monoclonais. **Instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2002.

TECHNOTE#101. Bangs laboratories. Seção “Technotes”. Disponível em: <www.bangslabs.com>, acesso em: 15 de novembro de 2007.

TUTEJA, R. Malaria – an overview. **FEBS Journal**, v. 274, p. 4670-4679, 2007.

WELLEMS, T.; HOWARD, R. Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. acad. Sci. USA**, v. 83, p. 6065-6069, 1986.

WHITTY, C. J. M.; ROWLAND, M.; SANDERSON, F.; MUTABINGWA, T. **Malaria. BMJ**, v. 325, 2002.

WILSON, N.; ADJEI, A.; ANDERSON, W.; BAIDOO, S.; STILES, J. Short report: Detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II in saliva of malaria patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78 (5), p. 733-735, 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Reports, ISBN 978 92 4 156369 7, 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Reports, ISBN 978 92 4 156390 1, 2009.

WONG, R. C.; TSE, H. Y. Lateral flow immunoassay. **Humana Press**, 2009

WONGSRICHANALAI, C.; BARCUS, M.; MUTH, S.; SUTAMIHARDJA, A.; WERNSDORFER, W. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77 (6), p. 119-127, 2007.

ZHANG, G.; GUO, J.; WANG, X. Immunochromatographic lateral flow strip tests. Avraham Rasooly e Keith E. Herold (eds.), **Methods in molecular biology: biosensors and biodetection**, v. 504, 2009.

8 - Anexos

Anexo 1

Ano : '2008'

Resumo Epidemiológico por local de notificação - Nacional

Ano 2008

Medida	Exame BP	Exame BA	Positivo BP	Positivo BA	Total Exame	Total Positivo	Autoctone	Importado UF	Importado Pais	Exame LVC	Positivo LVC	IPA	IFA	IAES	ILP	F	F+V	V	M	O
UF																				
AC	71.838	540.474	12.331	15.399	612.312	27.730	25.276	2.117	337	37.080	3.251	0,4	15,7	0,6	4,5	4.202	159	23.369	0	0
AM	508.158	589.841	93.101	41.228	1.097.999	134.329	133.130	878	315	119.961	23.766	6,7	15,1	4,9	12,2	19.197	1.088	114.044	0	0
AP	65.658	10.987	14.108	1.038	76.645	15.146	12.093	592	2462	8.420	2.293	2,1	20,5	1,1	19,8	2.721	387	11.990	48	0
MA	32.623	74.881	3.042	1.743	107.504	4.785	3.211	538	1035	11.112	1.684	0,0	16,6	0,0	4,5	723	73	3.987	1	1
MT	16.353	4.793	3.550	534	21.146	4.084	3.004	1.063	17	3.179	845	0,0	23,1	0,0	19,3	915	27	3.142	0	0
PA	240.959	167.894	52.886	16.388	408.853	69.274	67.398	1.238	642	54.776	14.856	0,2	16,6	0,1	16,9	10.753	753	57.740	27	1
RO	239.618	29.946	45.215	4.663	269.564	49.878	45.657	3.898	323	42.482	13.402	1,5	13,4	0,8	18,5	6.267	410	43.199	2	0
RR	75.646	55.516	8.494	1.745	131.162	10.239	9.211	101	927	7.305	2.076	2,5	14,1	3,2	7,8	1.376	69	8.794	0	0
TO	1.042	259	155	11	1.301	166	13	122	31	218	25	0,0	36,7	0,0	12,8	42	19	105	0	0
	1.251.895	1.474.591	232.882	82.749	2.726.486	315.631	298.993	10.547	6089	284.533	62.198					46.196	2.985	266.370	78	2

Anexo 2



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 o número 265/2006, intitulado: **“Desenvolvimento de insumos reagentes para diagnóstico rápido de malária”** 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, 15 de março de 2007.

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


.....
Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora

Anexo 3

Receita solução estoque 10x de PBS (tampão fosfato salina)

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 14,4 g Na₂HPO₄
- 2,4 g KH₂PO₄

Adicionar 800 ml de água destilada, ajustar pH para 7.4 e completar volume final para 1 L.

Anexo 4

Tabela de saturação de sulfato de amônia

Concentração final

Concentração
inicial

%	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10		28	57	86	118	137	190	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546
33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
55												33	67	103	141	179	220	264	307	353
60													34	69	105	143	183	227	269	314
65														34	70	107	147	190	232	275
70															35	72	110	153	194	237
75																36	74	115	155	198
80																	38	77	117	157
85																		39	77	118
90																			38	77
95																				39

Improving the production of the denatured recombinant N-terminal domain of rho-try-associated protein 2 from a *Plasmodium falciparum* target in the pathology of anemia in falciparum malaria

Luis Andre Mariuba¹, Patricia Puccinelli Orlandi¹, Márcia Medeiros², Rudson Holanda³,
Andrea Grava, Paulo Afonso Nogueira^{1/+}

Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz, Rua Teresina 476, 69057-070 Manaus, AM, Brasil ¹Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil ²Departamento de Parasitologia, Instituto Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil ³Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, Rondônia, Brasil

Rho-try-associated protein 2 (RAP2) is known to be discharged from rho-try onto the membrane surface of infected and uninfected erythrocytes (UEs) ex vivo and in vitro and this information provides new insights into the understanding of the pathology of severe anemia in falciparum malaria. In this study, a hexahistidine-tagged recombinant protein corresponding to residues 5-190 of the N-terminal of Plasmodium falciparum RAP2 (rN-RAP2) was produced using a new method of solubilization and purification. Expression was induced with D-lactose, a less expensive alternative inducer to the more common isopropyl-β-D-thio-galactopyranosidase. The recombinant protein was purified using two types of commercially-available affinity columns, iminodiacetic and nitrilotriacetic. rN-RAP2 had immunogenic potential, since it induced high titers of anti-RAP2 antibodies in mice. These antibodies recognized full-length RAP2 prepared from Triton X-100 extracts from two strains of P. falciparum. In fact, the antibody recognized a 29-kDa product of RAP2 cleavage as well as 82 and 70-kDa products of RAP1 cleavage. These results indicate that the two antigens share sequence epitopes. Our expressed protein fragment was shown to contain a functional epitope that is also present in rho-try-derived ring surface protein 2 which attaches to the surface of both infected and UEs and erythroid precursor cells in the bone marrow of malaria patients. Serum from malaria patients who developed anemia during infection recognized rN-RAP2, suggesting that this protein fragment may be important for epidemiological studies investigating whether immune responses to RAP2 exacerbate hemolysis in falciparum malaria patients.

Key words: *Plasmodium falciparum* - rho-try-associated protein 2 - 6xHis-tagged protein - purification - Western blotting

Rho-try-associated protein 2 (RAP2) is a 398-amino acid protein encoded by a single exon located on chromosome 5 of *Plasmodium falciparum* (Perez-Leal et al. 2005). It is discharged from rho-try, an apical organelle of the merozoite, onto the surface of the erythrocyte membrane during the blood stage of malaria infections. This discharge leads to the formation of a parasitophorous vacuole (PV) membrane. RAP2 is considered to be an important candidate for vaccine development, since monkeys immunized with RAP2 were partially protected against parasite challenge (Perrin et al. 1985, Ridley et al. 1990).

Douki et al. (2003) and Layez et al. (2005) provided new insights into the rho-try antigen, especially RAP2, by discharging this antigen onto the surface of uninfected erythrocytes (UEs) ex vivo and in vitro. These authors suggested that the anti-RAP2 specific immune

response plays a role in the pathology of severe anemia by inducing lysis of UEs immediately after discharge of this antigen onto the surface membrane.

Saul et al. (1992) cloned the entire *RAP2* gene and described its expression and purification using a hexahistidine system. Their methods yielded a low level of expression; further, the purification of RAP2 presented a range of difficulties due to the protein's lipophilicity. Expression in their study was induced using isopropyl-β-D-thio-galactopyranosidase (IPTG), which substantially raised the cost of protein production due to the many liters of culture necessary to obtain a reasonable amount of protein. The authors described that RAP2 precipitates even at very low concentrations in the absence of a strong detergent; 6 M guanidine was needed to solubilize inclusion bodies. Furthermore, Saul et al. (1992) reported that recombinant RAP2 could be eluted effectively only with a denaturation buffer containing 0.5 M imidazole (iDB) and not with a pH gradient.

In the present study, a hexahistidine-tagged RAP2 fragment containing the N-terminal (N-RAP2) residues 5-190 of *P. falciparum* RAP2 was produced. We achieved efficient induction of expression in *Escheria coli* using D-lactose as a less expensive alternative to IPTG. Furthermore, we compared the purifying power of two types of commercially-available affinity columns, iminodiacetic (Ni-IDA) and nitrilotriacetic (Ni-

Financial support: CNPq. PAN was supported by CNPq.

+ Corresponding author: paulonogueira@amazonia.fiocruz.br

Received 10 October 2007

Accepted 26 August 2008

NTA). Our expression system is relevant for future studies aiming to understand the molecular mechanisms of host-parasite interactions in falciparum malaria.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of N-RAP2 - Bioinformatic analyses were performed using DNASTAR software (DNASTAR Inc). The following primers were used in this study: 5' - ggatcctTTTATGTATTAGTTTT-3' (sense) and 5' - gaattcGGTGGTGGTGGTGGATCCTACTATAAAG-3' (anti-sense). These primers were designed based on the GenBank sequence XM-001351539. *P. falciparum* 3D7 parasites were cultured in vitro using routine methods and parasite extracts were prepared as previously described (Ljungström et al. 2004a, b). For amplification of a 585 bp fragment containing the N-terminal residues 5-190 of *P. falciparum* RAP2 (N-RAP2), PCR was performed with the following parameters: 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 1.5 min, 60°C for 1 min, 72°C for 1.5 min and a final 10 min incubation at 72°C. After agarose gel purification, the fragment was cloned into the pGEM T easy vector (Promega) and transformed into *E. coli* DH5a. White transformant colonies were screened using PCR.

The sequence of the cloned N-RAP2 DNA was confirmed using the Thermo sequence primer cycle sequencing kit. After digestion with *Bam* HI and *Eco* RI, the N-RAP2 fragment was sub-cloned into the pRSET vector (Invitrogen) and transformed into *E. coli* TG1. Colonies were screened by PCR using a primer for the T7 promoter (sense) and a RAP2 primer (anti-sense).

Expression and purification of recombinant N-RAP2 - Bacterial extract was prepared based on the methods of Petty (1996) with some modifications developed by our group. After transforming *E. coli* BL21 cells with the *RAP2-pRSET* construct, a single transformant colony was used to grow a 1 L culture in M9 synthetic medium supplemented with 100 µg/mL ampicillin at 30°C. When an optical density of 0.8 was reached, 10 g/L of D-lactose was added and the culture was incubated for another 16 h.

The culture was harvested by centrifugation (4000 rpm/15 min/4°C) and resuspended in MCAC buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 0.5 M NaCl; 10% glycerol; 0.15 mM PMSF) containing 33 µL of a protease inhibitory cocktail (0.1 µg/mL leupeptin and 0.1 µg/mL pepstatin). The cells were resuspended in the ratio of 2.5-5.0 mL of buffer per 50 mL of culture. Triton X-100 was added and three cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing at RT were performed. Deoxyribonuclease I was added at the concentration recommended by the supplier and the induced extract was harvested by centrifugation (15,000 rpm/15 min/4°C). Pellets were resuspended in denaturation buffer (DB) (8 M urea; 10 mM 2-mercaptoethanol; 20 mM Tris-HCl, pH 7.9; 0.5 M NaCl; 10% glycerol; 0.15 mM PMSF) and incubated at RT for 1-2 h on a horizontal shaker. The extract was then harvested by centrifugation (15,000 rpm/15 min/rt) and the denatured supernatant was stored at -80°C. A 5-L culture was also induced using 10 g/L of D-lactate and the denatured supernatant was prepared as described above.

Prior to purification, Ni-IDA and Ni-NTA affinity columns were equilibrated with MCAC buffer. The pH of the denatured supernatant was readjusted with 5N NaOH to 9.0 and the supernatant was incubated in batch with the affinity resin for 1 h at RT with rotation. In the Ni-NTA column, the resin was washed with 30 mL of DB at pH 6.3 adjusted with HCl 1M. It was gradually washed as follows with denaturation buffer (DB) containing increasing concentrations of imidazole (iDB): 1st, 10 mL of DB supplemented with 5 mM iDB; 2nd, 10 mL of 10 mM iDB; 3rd, 10 mL each of 15 mM iDB and 20 mM of iDB; finally, 10 mL of DB pH 5.9. The bound protein was eluted with DB at pH 4.5. Ni-IDA resin was similarly washed with 120 mL of DB in a 0-100 mM iDB gradient, and all elutions were performed with 1M iDB. For each resin, the purity of the final eluate was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining.

Preparation of anti-rN-RAP2 serum from mice - rN-RAP2 purified from the Ni-NTA column was quantified and 4 µg of protein was homogenized in complete Alum adjuvant. Three female BALB/c mice (6-8 weeks old) were immunized by intraperitoneal injection. After 15 days, a booster was performed under the same conditions. Sera were collected from the tail vein 15 days after the booster.

Preparation of total extract from Plasmodium 3D7 for Western blotting - A culture of *P. falciparum*, clone FCR3, was provided as a gift by Fabio Costa (Instituto de Biologia – Universidade de Campinas). Ring stage-rich parasites were subjected to osmotic lysis by diluting them 150 fold with ultrapure water containing protease inhibitors (0.1 µg/mL leupeptin, 0.1 µg/mL pepstatin, 0.15 mM PMSF and 5 mM EDTA). After 16 h of incubation at 4°C, the cellular lysate was harvested by centrifugation (15,000 rpm/4°C/2 h) and washed twice with ultrapure water containing protease inhibitors in order to eliminate any trace of hemoglobin. The pellet was resuspended in 100 µL of 1% Triton X-100 and incubated for 30 min on ice. Subsequently, the protein was harvested by centrifugation and the supernatant subjected to immunoblotting.

Immunoblotting to detect reactivity against rN-RAP2 - SDS-PAGE and Western blots were performed following routine methods. First, to confirm the expression of rN-RAP2, a lysate from *E. coli* BL21 pLysS transformed with the *RAP2-pRSET* plasmid was blotted onto a nitrocellulose membrane and probed with a commercially-available monoclonal antibody (mAb) (46-1008, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) against the histidine tag. Second, conformational and linear epitopes of rN-RAP2 were compared with those of native RAP2 obtained from extracts of *P. falciparum* 3D7 and FCR3 parasites. *E. coli* lysates and falciparum extracts were blotted onto nitrocellulose membranes and probed using murine anti-rN-RAP2 IgG antibodies raised as described above. Third, we determined whether rN-RAP2 contains a functional RSP2 epitope using an RSP2 mAb generously provided by Dr. Jurg Gysin from the Mediterranean University (Marseille, France). In all three blots, goat anti-mouse peroxidase was used as the secondary antibody.

In order to determine whether natural antibodies recognize the recombinant protein, purified rN-RAP2 was blotted onto a nitrocellulose membrane and incubated with human sera from malaria-infected individuals (a kind gift from Dr. Marcus Lacerda of Fundação de Medicina Tropical, state of Amazonas, Manaus, Brazil). Two black spots were drawn with a pencil to allow precise placement of the protein onto the nitrocellulose membrane. Goat anti-human peroxidase was used as the secondary antibody. Tetramethylbenzidine was used as the substrate in all reactions and the reactions were stopped after 30 min by washing with distilled water.

RESULTS

Sequencing and expression of recombinant N-terminal RAP2 - The 585 bp fragment containing the N-terminal residues 5-190 of *P. falciparum* RAP2 was sequenced and confirmed with 97 score the identity of the RAP2 fragment with RAP2 sequence XM_001351539 (Fig. 1). The rN-RAP2 was expressed in *E. coli* BL21 pLysS using D-lactose as an inducer. An antibody against the His tag was used to confirm the presence of hexahistidine in the ~27-29 kDa protein (Fig. 2).

Purification of rN-RAP2 - The rN-RAP2 was purified using two commercially-available affinity resins, Ni-IDA and Ni-NTA. Much purer protein was obtained on the Ni-NTA resin than Ni-IDA resin (Fig. 3). Despite extensive washing, the final preparation of protein from the Ni-IDA resin contained impurities visible by Coomassie blue staining (Fig. 3A). In contrast, no impurities could be detected using Coomassie blue staining on the

Ni-NTA resin (Fig. 3B). A test purification from 5 L of culture demonstrated that production could be scaled up for larger quantities (Fig. 4).

Recognition of rN-RAP2 by antibodies raised in mice - Mice immunized with rN-RAP2 in the presence of alum adjuvant developed high titers of anti-RAP2 antibodies, demonstrating the immunogenicity of this protein fragment (data not shown).

To characterize the conformational and sequence epitopes in rN-RAP2, anti-rN-RAP2 antibodies from immunized mice were analyzed for their ability to recognize native RAP2 prepared from the Triton X-100 protein extract from both erythrocyte membranes and the insoluble fraction containing parasites. The extracts were blotted onto nitrocellulose membranes and incubated with anti-rN-RAP2 sera from several mice (Fig. 5). Sera pooled from mice stimulated with alum adjuvant alone served as a negative control. In the soluble fraction, the pooled anti-rN-RAP2 sera recognized one protein of ~29 kDa. Two products of 70 kDa and 82 kDa were recognized in the insoluble fraction.

These results are similar to those of Stowers et al. (1996), who found that an anti-RAP1 mAb recognized the 65 kDa and 70 kDa products of RAP1 cleavage. Together with other fragments of 29 and 42 kDa, these products correspond to uncleaved and cleaved forms of RAP2 in Triton X-100 extracts from parasites. These products are formed prior to merozoite invasion (Howard et al. 1998). We chose to focus on rN-RAP2 rather than full-length RAP2 in our work because the former can be produced in much higher yields and is sufficient to induce

```
>ref|XM_001351539.1| G Plasmodium falciparum 3D7 rhoptry-associated protein 2
mRNA, complete cds
Length=1197

Score = 886 bits (442), Expect = 0.0
Identities = 456/466 (97%), Gaps = 0/466 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTATGTATTAGTTTTCTTATTTTATGTTTGAAGAATGTTGTAAGGGGATAAGTGT 60
Sbjct 13 TTTATGTATTAGTTTTCTTATTTTATGTTTGAAGAATGTTGTAAGGGGATAAGTGT 72

Query 61 GAAACTGAATTTTCAAATTTATATCCGGAATCAAATTCITTTGACTGGTTTAATTTATGCA 120
Sbjct 73 GAAACTGAATTTTCAAATTTATATCCGGAATCAAATTCITTTGACTGGTTTAATTTATGCA 132

Query 121 CACACTGCAATGTTTCATAAATTTATCTATGTTGGGTTTTATTTTATTAATCACTTTAGT 180
Sbjct 133 CACACTGCAATGTTTCATAAATTTATCTATGTTGGGTTTTATTTTATTAATCACTTTAGT 192

Query 181 AGTGCAGATGAATTAATAAAATTTTAGAAAAAACCACATAAATACITTTAGAAATAGT 240
Sbjct 193 AGTGCAGATGAATTAATAAAATTTTAGAAAAAACCACATAAATACITTTAGAAATAGT 252

Query 241 GATCATACTGTTTTGCTAGAGCAGTTACTTTAWATTTGTTTTATTACTATCTTAAGGAT 300
Sbjct 253 GATCATACTGTTTTGCTAGAGCAGTTACTTTATATTTGTTTTATTACTATCTTAAGGAT 312

Query 301 ATTAAGTCTATGTTAAGTACAGATGATTCACTGTCATTTTTAAGAATAAATCAAAGAT 360
Sbjct 313 ATTAAGTCTATGTTAAGTACAGATGATTCACTGTCATTTTTAAGAATAAATCAAAGAT 372

Query 361 ATTAATCCATGTTTAWTAAGWANTTTAWTTTTAATTTCTTAATGATAAGAGATTTATGGAA 420
Sbjct 373 ATTAATCCATGTTTAWTAAGWANTTTAATTTAATTTCTTAATGATAAGAAATTTATGGAA 432

Query 421 AATCTGGATTTATATATAATGARAGAATCTGAGAGARAAATTGG 466
Sbjct 433 AATCTGGATTTATATATAATGARAGAATCTGAGAGARAAATTGG 478
```

Fig. 1: confirmation of the identity of the 585 bp fragment containing the N-terminal residues 5-190 of *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated protein 2 (RAP2). The sequence of the cloned N-terminal of *P. falciparum* (N-RAP2) DNA was confirmed using the Thermo sequenase primer cycle sequencing kit.

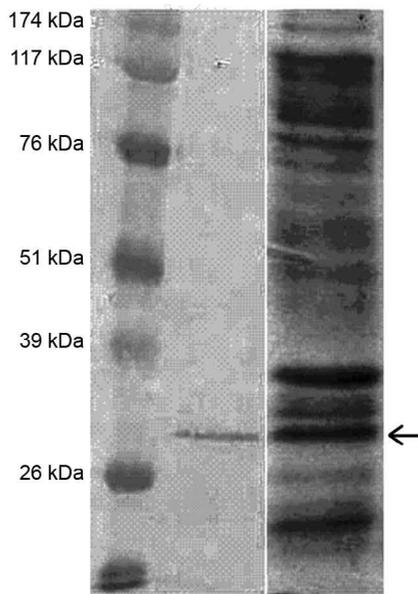


Fig. 2: confirmation of the presence of the hexahistidine tag in the N-terminal of *Plasmodium falciparum* (rN-RAP2) protein. Western blots showing binding of the protein by a commercially available monoclonal anti-histidine antibody. Antibody binding was revealed using an anti-mouse IgG antibody conjugated to peroxidase. The blot shows the fusion protein to have a mass of 27-29 kDa, consistent with the prediction.

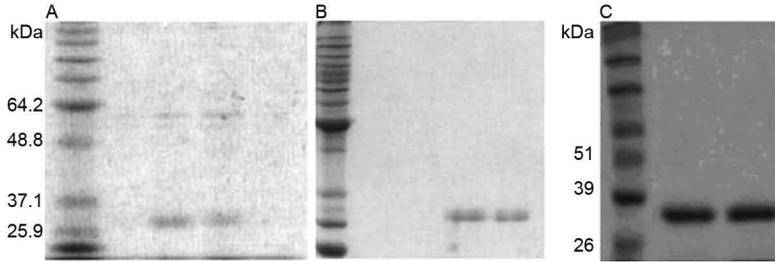


Fig. 3: a comparison of N-terminal of *Plasmodium falciparum* (rN-RAP2) purification using two different nickel affinity columns. SDS-PAGE analysis of rN-RAP2 purification using two commercially available columns. A: two eluates from a iminodiacetic (Ni-IDA) column contained impurities visible following by Coomassie blue staining; B: two eluates from a nitrilotriacetic (Ni-NTA) column showed no detectable impurities following Coomassie blue staining; C: improvement of rN-RAP2 purification. Higher yields of protein were achieved by increasing the culture volume and using the inexpensive inducer D-lactose. The protein elutes from a Ni-NTA column in two fractions, as shown by SDS-PAGE.

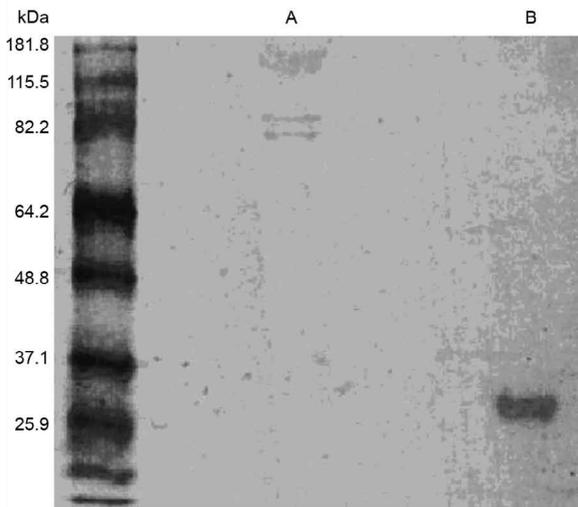


Fig. 4: characterization of cross-reactivity epitopes in N-terminal of *Plasmodium falciparum* (rN-RAP2). Western blot using anti-rNRAP2 mice IgG against extracts from two *P. falciparum* strains. Lanes A: recognition of proteins of ~70 and 82 kDa from insoluble Triton X-100 extracts. These bands correspond to two products of RAP1 cleavage; B: a 29-kDa band corresponding to a cleavage product of RAP2.

the production of specific polyclonal antibodies in mice that recognize RAP2 from two strains of *P. falciparum*. Furthermore, the fact that anti-rN-RAP2 antibodies recognize a cleaved form of RAP2 as well as two products of RAP1 processing indicates that (i) both antigens share sequence epitopes and (ii) these epitopes reside within the first 180 residues of RAP2.

Epitopes associated with host-parasite interaction in falciparum malaria - Recent studies have shown that the RSP2, a protein derived of rophtry encoded by a *RAP2* gene, is discharged onto the surface of both infected and UEs and erythroid precursor cells in the bone marrow of malaria patients (Douki et al. 2003, Layez et al. 2005). A mAb against RSP2 was able to detect rN-RAP2 (Fig. 6, Lane 2). This result shows that the recombinant N-terminal fragment of RAP2 protein expressed in *E. coli* possesses epitopes similar to those implicated in the molecular mechanism of host-parasite interaction in falciparum anemia (Douki et al. 2003, Layez et al. 2005).

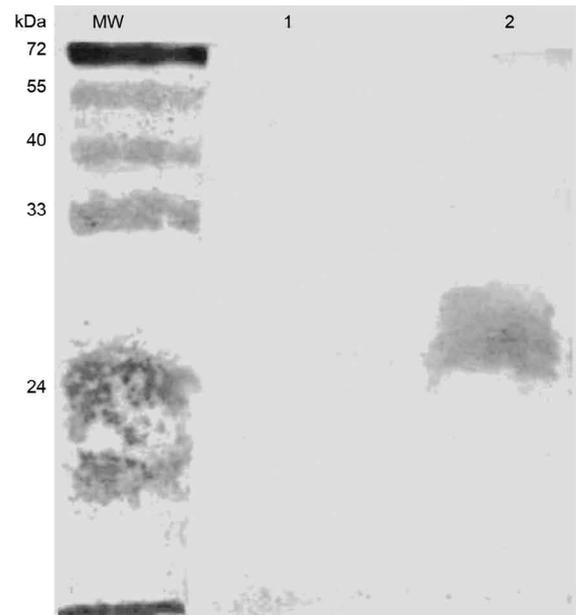


Fig. 5: detection of a functional epitope associated with host-parasite interaction in falciparum malaria. Western blot of two extracts of *Escherichia coli* BL21 pLysS containing rophtry-associated protein 2 (RAP2-pRSET) construct under (1) non-inducing and (2) inducing conditions. An anti-ring surface protein 2 (RSP2) monoclonal antibody was used as the primary antibody and goat anti-mouse IgG peroxidase was used as the secondary antibody. The protein (~29 kDa) present in the induced extract was recognized by an antibody against RSP2, demonstrating the presence of a target epitope on the expressed N-terminal of *Plasmodium falciparum* (rN-RAP2). This suggests that the N-terminal fragment contains an epitope involved in the host-parasite interactions in falciparum malaria recently described by Douki et al. (2003) and Layez et al. (2005).

Additionally, rN-RAP2 was recognized by serum from a malaria patient who developed anemia during infection (Fig. 6), demonstrating that this patient had antibodies against sequence epitopes found in our protein fragment. The successful purification of rN-RAP2 may permit epidemiologic studies aimed at determining the prevalence of anti-RAP2 antibodies in malaria patients with or without severe anemia and understanding the role of this target in the pathology of anemia in patients with falciparum malaria.

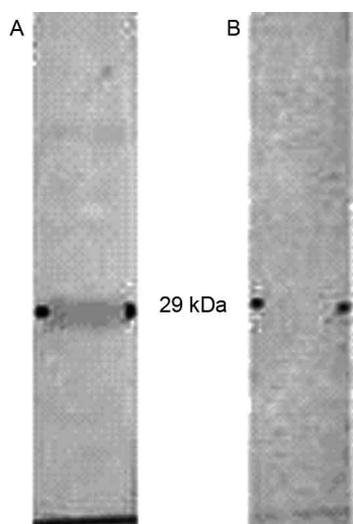


Fig. 6: recognition of N-terminal of *Plasmodium falciparum* (rN-RAP2) by sera of patients who developed anemia during malaria. Western blotting shows recognition of rN-RAP2 by human sera. A: serum from a human exposed to malaria. Two black spots were made with pencil to allow precise placement of the protein on the nitrocellulose. Goat anti-human peroxidase was used as the secondary antibody; B: serum from an individual with no past history of malaria served as the negative control.

DISCUSSION

The rhoptry organelles in the invasive merozoite form of *Plasmodium* species are thought to play a central role in the invasion of erythrocytes (Howard & Reese 1990). More specifically, they have been implicated directly in the sequence of events leading to host cell invasion, PV membrane formation and maintenance of the blood stage of the parasite cycle.

Here, we present a cost-effective method of RAP2 production developed by modifying the solubilization and purification methods of Stowers et al. (1995). In contrast to these researchers who used the full-length protein, we worked with the recombinant N-terminal fragment of RAP2 and achieved purification in denaturing conditions using 8 M urea. We eluted the recombinant protein using a pH gradient. Our results further indicate that the N-terminus portion has epitopes that are common to RAP1 and recognized by the immune system of patients exposed to malaria.

Initially, we obtained only very low levels of rN-RAP2. The fragment was undetectable by SDS-PAGE and Coomassie blue, but it could be observed in Western blots using a commercially-available mAb against hexahistidine. Saul et al. (1992) reported similar results when expressing this protein in *E. coli* clone SG13009 using the pDS56/RBSII hexahistidine vector. Many factors (e.g., the fact that RAP2 is a lipophilic protein) could contribute to this difficulty. The full-length protein contains five cysteines and codons rarely used in *E. coli*. Our N-terminal fragment has three of these cysteines and three rare codons. According to expression protocols, the oxidation of these cysteines may also make expres-

sion and solubilization difficult for inhibit growth of the host cells and rare codons can lead to a high level of frame shifting (QIAexpressionist 2003).

We have observed that D-lactose is as efficient as IPTG for inducing the expression of recombinant protein (data not shown). However, we did not compare expression yields in side-by-side experiments with D-lactose and IPTG as done by Woyski & Cupp-Vickery (2001), who performed such a comparison when inducing the expression of cytochrome P450s with D-lactose. According to these authors, IPTG is the most expensive component of expression experiments and its use at a concentration of 1 mM results in a cost of ~\$6.00/L of culture. In large-scale fermentation, the cost of IPTG could become significant; in our studies, for example, the IPTG for a 5 L production run would cost \$30. Instead, we used D-lactose at 10 g/L. This compound has a total cost of \$0.30 (\$0.06/L), which is 100 fold less expensive than IPTG. In this way, we removed the inducing agent as the most expensive part of expression.

Purification of rN-RAP2 on Ni-IDA resin was less efficient than that on Ni-NTA resin. Despite extensive washing using a gradient of 5-90 mM iDB, the eluate from the Ni-IDA contained impurities visible by Coomassie blue staining (Fig. 3A). However, using the Ni-NTA resin and performing the wash step with denaturation buffer at pH 6.3 and a quick gradient of 5, 10, 15 and 20 mM iDB was sufficient to eliminate Coomassie-visible impurities in the eluate (Fig. 3B). This difference in purification power may be due to the fact that Ni-IDA has only three metal-chelating sites and is unable to bind metal ions tightly. This weak binding leads to ion leaching when the resin is loaded with strongly chelating proteins and peptides or during wash steps. This results in low yields, impure products and metal-ion contamination of isolated proteins. In contrast, the Ni-NTA resin is a tetradentate chelating agent that binds nickel ions at four of the six ligand binding sites, leaving two sites free to interact with the His affinity tag. This means that Ni-NTA can bind metal ions much more tightly than Ni-IDA and it can retain them even under stringent wash conditions (QIAexpressionist 2003).

The data shown here indicate that rN-RAP2 produced by a convenient and inexpensive protein expression system in prokaryotes can elicit an IgG response in mice and that the antisera produced can recognize native antigens from two strains of *P. falciparum*. Our results show that rN-RAP2 shares at least one cross-reactive epitope with RAP1. The same data were found by Stowers et al. (1996), who detected 65 and 70 kDa products of RAP1 processing during merozoite invasion as well as other bands of 29 and 42 kDa in Triton X-100 parasite extracts. All of these bands correspond to uncleaved and cleaved forms of RAP2 (Howard & Reese 1998).

Stowers et al. (1996) demonstrated that anti-RAP2 antibodies cross-react with several linear epitopes of RAP1, such as C₃LTEFSKLY₁₂ in RAP2 and L₂₀₂TPLEELY₂₀₉ in RAP1. The authors noted that the cross-reactivity of anti-RAP2 antibodies with RAP1 occurs because the epitopes in the two proteins are identical in three of the four flanking amino acids (underlined). This region

of RAP1 has been shown to inhibit parasites in vitro and confer partial protection in monkeys (Ridley et al. 1990). RAP1 and RAP2, together with a poorly understood third protein RAP3, form a low molecular weight complex within the rhoptries of *P. falciparum*. Experiments in which the *RAP1* gene was disrupted have shown that RAP1 is required to localize RAP2 to rhoptries. RAP1 normally exists in complexes with RAP2 and RAP3, and some of these complexes are stabilized through merozoite invasion and the development of young ring-stage parasites (Balbi et al. 2002). Moreover, anti-RAP1 antibodies immunoprecipitate both RAP1 and RAP2 (Stowers et al. 1996). However, truncation mutants of RAP1 cause mislocalization of RAP2 but do not affect the efficiency of in vitro blood-stage growth. These results have suggested that the low molecular weight complex is not required for *P. falciparum* invasion and growth in human erythrocytes (Baldi et al. 2000), supporting the idea anti-RAP2 antibodies may not be involved in protection against the parasite.

The fact that rN-RAP2 could be detected by the same mAb that recognized the RSP2 attached on the surface of infected and UEs and by serum from a malaria patient who developed anemia indicates that the recombinant protein can still be recognized by the immune system. We have thus achieved the recombinant expression of rN-RAP2 containing a “ligand” sequence involved in the host-parasite interaction for attaching onto surface of infected and UEs.

Future studies with rN-RAP2 may permit better understanding of this target in the pathology of anemia in patients with falciparum malaria. Our expression system may therefore prove valuable for generating an immunogenic protein fragment for epidemiological studies designed to evaluate the effects of the anti-RAP2 immune response in anemic malaria patients.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr. Jurg Gysin, for providing the anti-RSP2 monoclonal antibody.

REFERENCES

Baldi DL, Andrews RFW, Roos DS, Howard RF, Crabb BS, Cowman AF 2000. RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The EMBO J* 19: 2435-2443.

Balbi DL, Good R, Duraisingh MT, Crabb BS, Cowman AF 2002. Identification and disruption of the gene encoding the third member of the low-molecular-mass rhoptry complex in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 70: 5236-5245.

Douki JL, Serkers Y, Lépolard C, Traoré B, Costa FTM, Sherf A, Gysin J 2003. Adhesion of normal and *Plasmodium falciparum*

ring-infected erythrocytes to endothelial cells and the placenta involves the rhoptry-derived ring surface protein-2. *Blood* 101: 5025-5032.

Howard RF, Narum DL, Blackman M, Thurman J 1998. Analysis of the processing of *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated protein 1 and localization of Pr86 to schizont rhoptries and p67 to free merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 92: 111-122.

Howard RF, Reese RT 1990. *Plasmodium falciparum*: hetero-oligomeric complexes of rhoptry polypeptides. *Exp Parasitol* 71: 330-342.

Layez C, Nogueira PA, Combes V, Costa FTM, Juhan-Vaghe I, Silva LHP, Gysin J 2005. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* 106: 3632-3638.

Ljungström I, Perlmann H, Schichtherle H, Scherf A, Wahlgen M 2004a. Parasites: Culturing of erythrocytic asexual stages of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. In I Ljungström, H Perlmann, H Schichtherle, A Scherf, M Wahlgen (eds), *Methods in malaria research*, Manassas, Virginia, p. 1-8.

Ljungström I, Perlmann H, Schichtherle H, Scherf A, Wahlgen M 2004b. Immunochemistry: I - Studies of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte surface. In I Ljungström, H Perlmann, H Schichtherle, A Scherf, M Wahlgen (eds), *Methods in malaria research*, 4th ed., Manassas, Virginia, p. 130.

Perez-Leal O, Patarroyo ME, Lopez Y, Cortes J, Rojas-Caraballo J, Gomez A, Moncada C, Rosas J 2005. Identification and characterization of the *Plasmodium vivax* rhoptry-associated protein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 853-859.

Perrin LH, Mekli B, Gabra MS, Stocker JW, Chizzolini C, Richle R 1985. Immunization with a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen induces a partial immunity in monkeys. *J Clin Invest* 75: 1718-1721.

Petty K 1996. Metal-Chelate Affinity Chromatography. *Curr Protoc Protein Sci* 9.4.1-9.4.16.

QIAexpressionist 2003. QIAGEN, 5th ed., Valencia, USA, p. 18-20.

Ridley RG, Takacs B, Etlinger H, Scaife JG 1990. A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* is protective in *Saimiri* monkeys. *Parasitology* 101: 187-192.

Saul A, Cooper J, Hauquitz D, Irving D, Cheng Q, Stowers A, Limpaiboon T 1992. The 42-kilodalton rhoptry-associated protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 50: 139-150.

Stowers A, Prescott N, Cooper J, Takacs B, Stueber D, Kennedy P, Saul A 1995. Immunogenicity of recombinant *Plasmodium falciparum* rhoptry associated proteins 1 and 2. *Parasite Immunol* 17: 631-642.

Stowers AW, Cooper JA, Ehrhardt T, Saul A 1996. A peptide derived from a B cell epitope of *Plasmodium falciparum* rhoptry associated protein 2 specifically raises antibodies to rhoptry associated protein 1. *Mol Biochem Parasitol* 82: 167-180.

Woyski D, Cupp-Vickery R 2001. Enhanced expression of cytochrome P450s from lac-based plasmids using lactose as the inducer. *Arch Biochem Biophys* 388: 276-280.

Antibodies to the *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RAP-2/RSP-2 in relation to anaemia in Cameroonian children

N. AWAH,¹ H. BALOGUN,¹ E. ACHIDI,² L. A. MARIUBA,³ P. A. NOGUEIRA,⁴ P. ORLANDI,⁴ M. TROYE-BLOMBERG,¹ J. GYSIN⁵ & K. BERZINS¹

¹Department of Immunology, Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Stockholm, Sweden, ²Faculty of Health Sciences, University of Buea, Buea, Cameroon, ³Universidade Federaldo Amazonas, Manaus, AM, Brazil, ⁴Leonidas and Maria Deane Institute, Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ, Manaus, AM, Brazil, ⁵Host Pathogen Interactions Unit, Institute Pasteur, Guadeloupe, Abymes Cedex, France

SUMMARY

Previous studies have implicated reactive antibodies to the low molecular weight rhoptry-associated proteins (RAP-1, RAP-2/RSP-2 and RAP-3) in erythroid cell destruction during *Plasmodium falciparum* infection. In this pilot study, the frequency, specificity and functional capacity of naturally acquired anti-RAP-2/RSP-2 antibodies were investigated in the sera of anaemic and nonanaemic malaria-infected Cameroonian children. All sera recognized RAP-2/RSP-2 by FACS, irrespective of the clinical status of the subjects. However, the anaemic children showed higher levels of IgG antibodies than the nonanaemic group, while both groups showed similar levels of IgM antibodies. Only few individuals had detectable levels of RAP-2/RSP-2-specific IgG1 and IgG3 subclass antibodies, while no IgG2 and IgG4 subclass antibodies were detected in these subjects. By ELISA, the anaemic group tended to show higher levels of antibodies to RAP-2/RSP-2 regarding all antibody classes tested, except for IgG4 and IgE. Unexpectedly, sera from the nonanaemic group activated complement to a greater extent than those from the anaemic group. These results need to be confirmed in extended studies but indicate that the effector functions of the RAP-2/RSP-2-reactive antibodies may be more important than their amounts. Such antibodies could play a role in both immunity and pathogenesis during *P. falciparum* infection.

Keywords antibodies, complement, malarial anaemia, phagocytosis, *Plasmodium falciparum*, Rhoptry-associated protein-2 (RAP-2/RSP-2)

Correspondence: Nancy Awah, Wenner-Gren Institute, Department of Immunology, Stockholm University, Svante Arrhenius väg 20C, SE10691, Stockholm- Sweden (e-mail: nancy.awah@imun.su.se).

Disclosures: None.

Received: 9 April 2010

Accepted for publication: 24 August 2010

INTRODUCTION

Infection with *Plasmodium falciparum* can cause a wide spectrum of illness, ranging from asymptomatic infections, through acute febrile disease, to severe malaria and eventually death (1). Severe malaria (SM) encompasses the major life-threatening clinical syndromes in patients with malaria, which include cerebral malaria (CM), severe malarial anaemia (SMA), respiratory distress syndrome and pregnancy-associated malaria (2–4). Annually, SM causes at least 1 million deaths, most of which occur in African children <5 years of age (5). Why some infected individuals progress to severe disease and not others remains intriguing and not well understood, but both parasite and host factors appear to have a role in this context (6).

The blood stages of *P. falciparum* inevitably cause anaemia, which continues to be a major threat to life in the developing world (2). Children and pregnant women remain the most afflicted and susceptible during malaria infection. Compared to CM, not much is known about the host and parasite factors that contribute to malarial anaemia or the mechanisms involved. Malarial anaemia is characterized by a drop in haemoglobin levels, and a haemoglobin value of <5 g/dL is considered to represent severe malaria anaemic (SMA) (3,7). Severe anaemia can be observed during acute infections with high parasitaemia, as well as in patients carrying low levels of parasitaemia. In some instances, malarial anaemia may appear as a result of chronic subclinical infection, and it can persist for weeks following complete therapeutic clearance of parasites (3,8–14).

The aetiology of SMA is multifactorial and incompletely understood but is thought to partly arise from mechanisms involving an increased destruction of non-parasitized and parasitized red blood cells, as well as from an impaired erythropoiesis, probably owing to bone marrow suppression (15). The different mechanisms that

target uninfected RBCs for destruction remain unclear but may occur through immunological mechanisms, involving antibodies and complement binding to the RBC surface, resulting in phagocytosis and/or complement-mediated lysis (16). The target antigens in this context may be parasite-derived antigens nonspecifically adsorbed to the RBC surface (17–20) or RBC antigens binding auto-antibodies (21,22).

Following successful invasion, the developing parasite induces a number of changes on the surface of the RBC, including the insertion or binding of a number of parasite-derived proteins to the RBC membrane, e.g. PfEMP-1 (23) and RAP-2/RSP-2 (17,24). PfEMP-1 is a major component of the knob-like structures expressed on the RBC surface by the intracellular parasite, which increase the rigidity of the cell. RAP-2/RSP-2 is a rhoptry-associated protein, which forms a complex with two other rhoptry antigens, RAP-1 and RAP-3 (25,26). RAP-2/RSP-2 has been shown to be the dominant protein transferred to the surface of normal erythrocytes during delayed or aborted reinvasion (17,24,27). Antibodies to this protein are known to mediate protection in immunized monkeys and to inhibit parasite growth *in vitro* (27,28). We and others have identified RAP-2/RSP-2 as a potential key player and culprit in mechanisms leading to the development of malarial anaemia (17,20).

Antigens expressed on the surface of *P. falciparum*-infected erythrocytes represent a first line of accessible targets for protective antibodies, involving opsonization, phagocytosis and complement activation. These processes may be involved in the control of parasitaemia but have also been implicated in disease pathogenesis, indicating that antibodies to the low molecular weight rhoptry proteins may be important in protective and/or pathogenic immune responses during malaria infections (17,20). The present study aimed at investigating the prevalence of naturally acquired anti-RAP-2/RSP-2 antibodies, in terms of quantity and quality, in the sera of anaemic and non-anaemic malaria-infected children residing in a malaria-endemic region of Cameroon.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and cells

The parasites used in the study were of the *P. falciparum* laboratory strains, placental strain no. 193 (193-CSA) from Cameroon (29) and D10ΔRAP-1, a mutant parasite lacking RAP-1 and RAP-2 on its surface (25). Blood-stage parasites were maintained *in vitro* as described previously (30) using human type O⁺ erythrocytes in RPMI 1640 supplemented with Albumax II (Gibco-Invitrogen, Paisley,

UK). Late stages were enriched by gelatin floatation (Plasmion; Fresenius Kabi, Sèvres, France) (20,31) and sub-cultivated at 8% parasitaemia for use in the different assays. The human monocytic cell line (THP1) cells (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, USA) were grown to logarithmic phase in RPMI-GlutaMax (Gibco-Invitrogen) supplemented with 5% foetal calf serum (FCS, Gibco-Invitrogen), penicillin-streptomycin and L-glutamine (monocyte medium). A total of 5×10^4 THP1 cells per 200 μ L RPMI/2% FCS were placed in round-bottomed 5- mL polypropylene FACS tubes (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) and kept at 37°C for 1 h before use.

Antibodies and specificities

Both mouse and human monoclonal antibodies (mAb) were employed in this study and included: 26G1/B4 (mouse mAb to RAP-2/RSP-2, referred to as B4) of IgG2a isotype (20).

Study area

The study was conducted in the Buea district, located at the foot of Mt. Cameroon, in south-western Cameroon. This study area experiences two seasons: the dry (November–March) and the rainy (March–October, when malaria transmission is more intense) seasons. Malaria transmission is hyperendemic with perennial transmission. *Plasmodium falciparum* accounts for more than 90% of malaria infections in this area, and *Anopheles gambiae* is the dominant vector species (32). Malaria prevalence attains 70–85% during the peak transmission season, which drops to 30% during the low-transmission season, the dry season (33).

Study population

Case definition

Inclusion criteria for patients with malaria were fever (temperature $>37.5^\circ\text{C}$) measured within 24 h of admission, malaria parasite density >1000 parasites/mL of blood and at least one other sign of malaria (vomiting, diarrhoea, malaise, etc.). Study participants with the sickle-cell trait were excluded.

Specific inclusion and exclusion criteria

Severe malaria anaemia cases had haemoglobin ≤ 5 g/dL, were fully conscious, with no incidences of severe bleeding reported or observed convulsions and absence of helminthic or schistosomiasis infections.

The mean age of the severe anaemia children was 2.61 ± 2.25 (range: 1–11 years) with a median of 2.0. The age-matched controls were either pupils in primary schools within the study area or young children who presented for vaccination at the only children welfare clinic.

Human plasma samples

Plasma samples used consisted of ≤ 5 -year-old anaemic ($n = 25$) and nonanaemic ($n = 29$) age-matched children who were part of a hospital-based case-control study investigating the pathogenesis of severe malaria at the Malaria Research Unit, University of Buea, Cameroon (34). Because of the large sample size, age-matched anaemic and nonanaemic samples included in the current study were randomly selected following odd serial numbers. As negative control, a pool of plasma from healthy Swedish blood donors, who had never been exposed to malaria, was used. Samples were heat-inactivated for 30 min at 56°C , cooled on ice and then diluted 1 : 10 in Tris-Hank. To ensure specificity of antibodies to RAP-2/RSP-2, each sample was pre-adsorbed twice on D10 Δ RAP-1-mutant-infected erythrocytes (17,25) which do not express RAP-1 and RAP-2 on their surface (3×10^7 infected erythrocytes per 50 μL of serum) for 30 min at 37°C (with intermittent mixing) before use.

Immunofluorescence microscopy

Erythrocytes were studied by a liquid immunofluorescence (L-IFA) assay (27). Briefly, 5 μL of infected erythrocytes were labelled with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; Merck, Darmstadt, Germany) for 45 min in a 37°C water bath. They were then incubated with adsorbed human sera or B4 for 30 min at 4°C . The cells were washed thrice and incubated with a goat anti-human or anti-mouse IgG (F(ab')₂) conjugated to Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) as applicable (diluted 1 : 200) for 30 min at 4°C .

For co-localization studies, the secondary antibodies were a goat anti-human Alexa-564 or a F(ab')₂ goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) Alexa-488 (Molecular Probes). Each of the two primary and two secondary antibodies was applied sequentially, with washing in between applications. The slides were mounted with SlowFade Gold antifade reagent (Molecular Probes). For all assays, a pool of sera from nonexposed Swedish donors or a mouse IgG2a mAb with an unrelated specificity (Immunotech, Marseille, France) served as controls. Immunofluorescence signals were detected with a Leica fluorescence microscope (Mag. 63x) equipped with a camera linked to an IM500 image acquisition software.

Assessment of the humoral immune responses against *Plasmodium falciparum* rophtry-associated protein-2 by flow cytometry and ELISA

Naturally occurring antibody responses to *P. falciparum* RAP-2 were measured against a recombinant RAP-2 (35) by ELISA and against the whole parasite antigen using parasites from infected cultures (here considered to as native RAP-2) by flow cytometry.

When using flow cytometry, erythrocytes were labelled with 100 μL of 20 μM DRAQ5 solution (Biostatus, Leicestershire, UK) or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dihydroethidine (HE; Polybiosciences, Warrington, PA, USA) as applicable per 5×10^4 erythrocytes to allow discrimination between infected erythrocytes containing nucleic acid and uninfected erythrocytes. Labelled erythrocytes were then mixed with 100 μL of each human serum, followed by goat anti-human IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-human IgG1 and phycoerythrin-conjugated goat anti-human IgG2 (Beckman Coulter, Paris, France), FITC-conjugated goat anti-human IgG3 (Sigma, MO, USA), phycoerythrin-conjugated goat anti-human IgG4 (Beckman Coulter) and goat anti-human IgM, all diluted 1 : 200. The antibodies were diluted in PBS, and 100 μL of the dilution were added per sample. At each step, samples were incubated for 30 min at 4°C . The samples were washed three times in 200 μL PBS between the incubations. Fluorescence acquisition was performed on a BD FACSCalibur Flow Cytometer (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). All data were analysed by CELLQuestTM PRO software (BD version 5.2.1). Uninfected and infected erythrocytes were gated according to DRAQ5 fluorescence in the FL3 channel or dihydroethidine fluorescence in the FL2 channel. For the quantification of FITC and PE fluorescence, the median fluorescence intensity (MFI) values were used.

Plasmodium falciparum-specific reactive antibodies of IgM, IgG and IgE as well as IgG subclasses were also determined by ELISA. Briefly, EIA/RIA plates (Costar, Corning, NY, USA) were coated with 50 μL of recombinant RAP-2 (rRAP-2) at a concentration of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in sodium bicarbonate buffer (pH 9.6). The coated plates were incubated at room temperature overnight. After blocking at 37°C with carbonate buffer containing 1% BSA (w/v) for 2 h, plates were washed with saline containing 0.05% Tween 20. Test sera [diluted 1 : 100 for IgG, 1 : 500 for IgM, 1 : 400 IgG1 and IgG3, 1 : 20 for IgG2 and IgG4, and 1 : 10 for RAP-2-reactive IgE (SIgE.)] were then added in duplicates into the plates and incubated for 1 h at 37°C . Bound antibodies were detected with ALP-conjugated goat anti-human IgM, IgG or IgE antibodies, as applicable.

For total IgE (TIgE) detection, ELISA plates were coated with affinity-purified goat anti-human IgE. Total IgE was detected with biotinylated goat anti-human IgE. Optical densities at 405 nm (OD405) were read using a kinetic microplate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA).

All antibody concentrations, expressed as ELISA units (a $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalent), were calculated from standard curves obtained by incubating serial dilutions of a purified standard for the appropriate human isotype with the aid of SoftMax Pro 5.2 software (Molecular Devices Corp). Sera from Swedish donors not exposed to malaria were used as negative controls. Positive signals were then considered those greater than mean plus 2 deviations of Swedish sera.

Analysis of complement activation by flow cytometry

Complement activation on RBCs from 193 parasitized cultures was carried out as previously described, with some modifications (17,20). Briefly, HE-labelled parasites (5×10^7 RBC) were incubated with individual plasma sample prepared and diluted as mentioned earlier, followed by incubation with a complement positive or negative serum (Sigma) diluted 1 : 20 and adsorbed on a culture of infected RBCs (10^7 cells per $50 \mu\text{L}$ serum). Bound complement was detected with a FITC-conjugated chicken IgY anti-human complement component C3, diluted 1 : 400 (Cedar-Lane, Hornby, ON, Canada). All dilutions were in RPMI 1640 medium, and incubations were carried out at 37°C for 30 min with three washes in between each incubation step. RBCs were then analysed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest™ software (Becton-Dickinson). A parallel immunofluorescence assay was also performed to determine the proportion of RAP-2/RSP-2+ erythrocytes (RBC RSP-2+) as previously described (17,20). Briefly, 5×10^7 RBCs were labelled with HE to allow for the discrimination of infected and normal RBCs followed by incubation with each individual plasma. The secondary antibody was a goat anti-human IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Data acquisition and analysis was performed on a FACSCalibur flow cytometer equipped with CELLQuest™ software (Becton-Dickinson). Uninfected and infected erythrocytes were gated according to Alexa Fluor 488 fluorescence in the FL1 channel or HE fluorescence in the FL2 channel. The percentages of infected RBCs (FL1 and FL2 positive) and normal RBCs (FL1 only) positive for RAP-2/RSP-2 were then recorded. All dilutions were in RPMI 1640 medium, and incubations were carried out at 37°C for 30 min with three washes in between each incubation step.

Erythrocyte opsonization and THP1 phagocytosis

Phagocytosis was performed according to the method of Tippet *et al.* (36) with some modifications. Plasmion-enriched cultures were used in the assay. RBCs from a culture following reinvasion were doubly stained with FITC (Sigma) and HE (Polybiosciences) to distinguish infected RBC (HE and FITC positive) from noninfected RBCs (FITC positive). Briefly, RBCs were resuspended to $10^8/\text{mL}$ in fresh 0.5 M sodium bicarbonate, pH 9.0, and labelled with $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ of FITC for 30 min at room temperature with constant agitation, washed three times in cold PBS and then labelled with dihydroethidine ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$ for 30 min at room temperature). The RBCs were then opsonized with individual sera under gentle intermittent agitation. Opsonized cells were washed thrice, resuspended in $100 \mu\text{L}$ of monocyte medium and incubated with 5×10^4 THP1 cells as targets (at a ratio of 20 : 1 targets to phagocyte) in 5-mL FACS tubes (BD Falcon, Bedford, MA, USA) as described earlier. Tubes were then incubated under shaking at 37°C for 30 min.

Uningested RBCs were lysed with 1 mL ammonium chloride lysing solution (http://wwwbdbiosciences.ca/canada/downloads/is_protocols/IF_WB_AmCl.pdf) at RT for 3 min, with 30 s of vortexing after the addition of the lysis buffer. Cells were washed twice with 3 mL ice cold PBS/1% FCS. Viable THP1 cells were identified via light scatter characteristics, and the MFI of cells that had phagocytized noninfected or infected RBCs was determined using FITC and HE fluorescence, respectively. Gates were set based on a negative control sample of stained nonopsonized erythrocyte cultures incubated with THP1 cells in parallel. Control incubations were carried out at 4°C with opsonized parasitized cultures to prevent phagocytosis and to confirm efficient lysis of adherent noninternalized erythrocytes. Additional serum controls included a serum pool from malaria nonexposed Swedish blood donors. Cells were analysed on a FACSCalibur using CellQuest™ software (Becton-Dickinson). To determine the actual phagocytosis, relative fluorescence intensities were obtained by subtracting the MFI of the control sera from the sample.

Haemoglobin values

Haemoglobin levels of the study children were determined using a HemoCue haemoglobinometer (HemoCue, Ångelholm, Sweden) according to the manufacturer's instructions (34).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with StatView version 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) software.

The nonparametric Wilcoxon rank sum (Mann–Whitney) test was used to test for differences in continuous variables between two groups. Correlations were estimated using the Spearman correlation coefficient (nonparametric correlation). The difference between groups in the prevalence of immune responders was assessed using Fisher's exact test. A *P*-value of 0.05 or less was considered as statistically significant. A Bonferroni correction was used for the case of multiple comparisons, and $\alpha_b = 0.05/n_t$ where α_b is the significance level after the Bonferroni correction and n_t the number of tests in the set. Hence, *P*-values larger than α_b will not be considered significant. Statistical assistance was provided by the division of mathematics at Stockholm University.

RESULTS

Recognition of RAP-2/RSP-2 by naturally acquired antibodies

Surface immunofluorescence was performed on live parasite cultures containing trophozoites of the 193-CSA strain of *P. falciparum*, using selected absorbed human plasma samples from Cameroonian children and previously characterized mouse mAbs to RAP-2/RSP-2 (27). All sera tested were positive in immunofluorescence giving a punctuated surface staining pattern of both infected and noninfected RBCs typical of RAP proteins (Fig. 1a). In addition, co-localization was apparent between mAb B4 (green) and sera (red) as shown in the merged pictures (yellow) (Fig. 1b).

Characterization of naturally occurring antibody responses to RAP-2/RSP-2

As a prelude in characterizing the immune response to RAP-2/RSP-2, the frequency at which individuals naturally exposed to *Plasmodium* infection develop antibodies to this antigen, as well as the levels of such antibodies was determined by both flow cytometry and ELISA.

Flow cytometry

Analysis by flow cytometry confirmed the data from the immunofluorescence analysis, showing that essentially all the Cameroonian children tested had IgG antibodies to RAP-2/RSP-2 as determined by the median fluorescence intensities (MFIs). Individuals in the anaemic group showed significantly higher IgG antibody MFI levels compared to those in the nonanaemic group [geometric mean (GM) 171 and 142, respectively: $P = 0.029$] (Table 1A). The MFIs of IgM antibodies were lower when compared to

those of the IgG antibodies, and there was no significant difference in the IgM MFIs between the two groups of children (Table 1A). With respect to IgG subclasses of the antibodies, only a few individuals in both the anaemic and nonanaemic group (8 anaemic and 6 nonanaemic) showed MFIs to RAP-2/RSP-2-reactive IgG1 at low levels, while IgG3 antibodies, also at low MFIs, were found at a somewhat higher frequency, especially in the nonanaemic group of children (12 anaemic and 22 nonanaemic). In general, the individuals showing IgG1 and IgG3 antibody reactivity were those with seemingly elevated levels of IgG antibodies. The nonanaemic group showed significantly higher MFIs of RAP-2/RSP-2-reactive IgG3 antibodies than the anaemic group ($P = 0.012$, Table 1A), and this remained significant following Bonferroni correction ($P \leq 0.0125$). There were no detectable levels of IgG2 and IgG4 in any of the two groups of children.

ELISA

Anti-rRAP-2/RSP-2 antibodies in the sera of anaemic and nonanaemic children were also analysed by ELISA and expressed as relative concentrations. The levels of IgG, IgM and IgG1, IgG2 and IgG3 were higher in the anaemic group compared to nonanaemic children, while total and specific IgE levels were higher in the nonanaemic children, although these differences were not statistically significant (Table 1B). However, there was a significant difference between the two groups regarding the levels of IgG4, which were higher in the nonanaemic group of children ($P = 0.037$) (Table 1B). However, this significance was lost following Bonferroni correction. The frequencies of immune responders for the various antibody classes tested (those individuals with antibody levels + 2 SD that of Swedish controls) were as shown in Table 2. The anaemic group of children tended to have higher frequencies of IgG, IgM and IgG1, IgG2 and IgG3 compared to non anaemic children, while the reverse was true for IgG4, as well as for the total and RAP-2/RSP-2-specific IgE. These differences were however not statistically significant.

Comparison of antibody levels by flow cytometry and ELISA

The two methods used for quantifying the antibody levels (flow cytometry and ELISA) were compared with regard to IgM, IgG, IgG1 and IgG3 only because by flow cytometry, IgG2 and 4 levels were below detectable limits and IgE levels were not determined. A significant positive correlation was observed with regard to IgG ($P = 0.049$), IgG3 ($P = 0.035$) and IgG1 ($P = 0.049$) only in the anaemic subjects (data not shown).

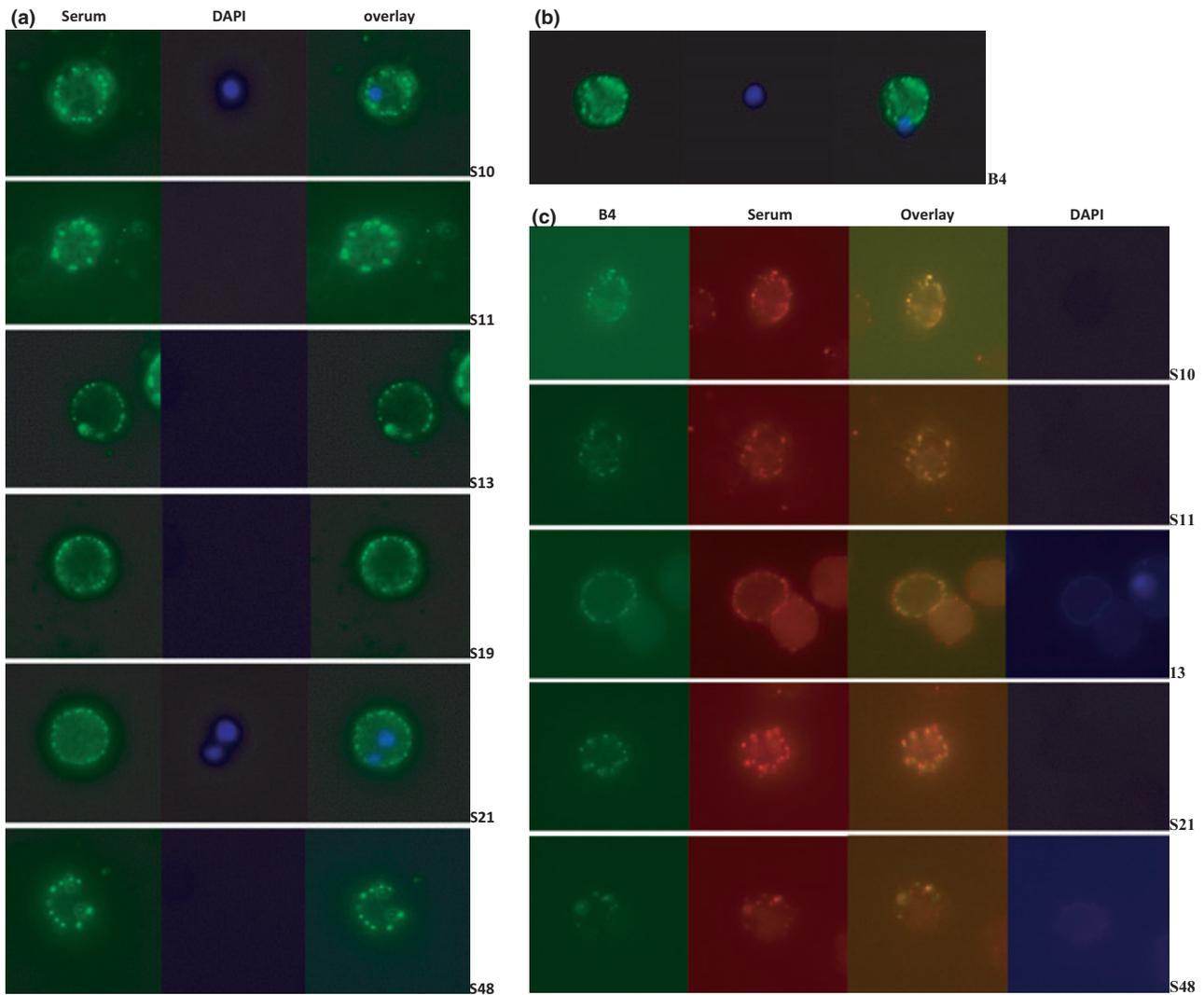


Figure 1 Liquid immunofluorescence assay (L-IFA) on 193^{CSA} parasites exhibiting typical punctuated rhoptry staining with sera (S) from malaria-infected individuals (S10, S11 and S13: anaemic subjects; and S19, S21 and S48: nonanaemic subjects). (a) Single staining with the different sera and mAb B4. (b) Superimposition of mAb B4 (green) and the different sera (red) showing co-localization (yellow). The parasite DNA is stained with 4'5'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI: blue).

Antibody recognition of RAP-2/RSP-2-tagged erythrocytes and complement activation

The analysis by flow cytometry revealed that the anti-RAP-2/RSP-2-reactive antibodies in patient sera recognized a greater proportion of RAP-2/RSP-2-positive normal RBCs (FITC fluorescence) than infected erythrocytes (FITC and HE fluorescence). For most individuals, this recognition appeared to be independent of the antibody levels (data not shown). Sera from the nonanaemic individuals labelled a greater proportion of RAP-2/RSP-2+ RBC (RBC RAP-2+) compared to the anaemic sera,

despite having lower levels of RAP-2/RSP-2-reactive IgG. This difference was found to be significant (median values 24 and 60 for anaemic vs. nonanaemic subjects, respectively, $P = 0.0007$) (Fig. 2a). This was also true with regard to the ability of the different sera to activate complement, where the sera from anaemic individuals activated complement less (as determined by C3 binding: RBC C3+ with respect to the relative MFIs) compared to the nonanaemic sera (median MFI values 28 and 88 for anaemic vs. nonanaemic individuals, respectively, $P < 0.0001$) (Fig. 2a). In addition, there was a significant correlation between the percentage of RAP-2/RSP-2+

Table 1 Isotype distribution of antibodies to RAP-2/RSP-2 in anaemic and nonanaemic individuals by flow cytometry (A) and ELISA (B)

Descriptive statistics					
Anaemic			Nonanaemic		
Antibody	GM	Range	GM	Range	P-value
A					
IgG	171·115	109–342	142·085	92–204	0·029
IgM	95·825	52–153	85·833	35–168	0·196
IgG1	0·277	0·12–6·0	0·197	0·12–4·0	0·397
IgG3	0·961	0·2–24·0	1·253	0·2–12·0	0·012
IgG2	ND	–	ND	–	–
IgG4	ND	–	ND	–	–
IgE	N/A	–	N/A	–	–
TIgE	N/A	–	N/A	–	–
^a No.	25		29		
B					
IgG	1·304	0·336–10·1	0·952	0·253–18·73	0·10
IgM	5·154	1·20–55·7	4·397	1·271–7·06	0·50
IgG1	0·917	0·20–4·6	0·658	0·18–4·52	0·10
IgG3	1·015	0·23–7·12	0·888	0·200–4·228	0·05
IgG2	0·010	0·001–0·209	0·007	0·001–0·180	0·20
IgG4	0·026	0·004–0·643	0·057	0·004–0·334	0·03
IgE	108·228	32·2–347	135·376	30–726	0·20
TIgE	22·944	6·30–379	34·774	1·44–1705	0·40
^b No.	25		29		

(A) Values are expressed as geometric means (GM) of fluorescence intensities. (B) Values are expressed as geometric means (GM) of ELISA units, while RAP-2/RSP-2-specific IgE and total IgE (TIgE) are expressed as GM ELISA units $\times 10^{-3}$. Differences between anaemic and nonanaemic individuals were tested by non-parametric Mann–Whitney *U* tests ($P \leq 0\cdot05$). Following Bonferroni correction, only IgG3 remained significant at $P \leq 0\cdot0125$ (i.e. $\alpha_b = 0\cdot05/4$) by FACS, while by ELISA, all significances were lost at $P \leq 0\cdot0063$ (i.e. $\alpha_b = 0\cdot05/8$). ^{a,b}Number of individuals per group, ND: Not detected, N/A: Not done.

RBC with the degree of complement activation (MFI RBC C3+) ($P < 0\cdot0001$) (Fig. 2b).

Anti-RAP-2 antibodies induce the phagocytosis of RAP-2-tagged erythrocytes

Phagocytosis was analysed by FACS. THP1 monocytic cells were allowed to interact with erythrocytes from malaria-infected cultures stained with FITC and HE and then opsonized with human sera. Using the relative MFIs, a tendency for higher levels of phagocytosis was observed with sera from the nonanaemic (MFI = 185) individuals compared to the anaemic sera (MFI = 182), although phagocytosis was more frequently observed with sera from the anaemic individuals. These differences were however not statistically significant ($P = 0\cdot50$) (Fig. 3).

Table 2 Frequency of immune responders by ELISA

Antibody isotype	Anaemic (%) ^a	Nonanaemic (%) ^a
IgG	88	90
IgM	84	93
IgG1	68	48
IgG3	80	86
IgG2	32	21
IgG4	40	62
IgE	44	66
TIgE	64	66
^b No.	25	29

^aThe percentage of immune responders for the various antibody classes tested (those individuals with antibody levels +2 SD that of Swedish controls); ^bTotal number of individuals in each group. TIgE: Total IgE.

DISCUSSION

The present study confirms and extends previous data on the potential role of RAP-2/RSP-2 and antibodies to this antigen in the development of malarial anaemia (17,20). Antibodies to RAP-2/RSP-2 were previously shown to induce phagocytosis and complement-mediated destruction of RAP-2/RSP-2-tagged erythroid cells *in vitro*, which may contribute to the development of anaemia (20). The present data show that natural infections with *P. falciparum* induce antibodies against RAP-2/RSP-2, which react with the surface of RAP-2/RSP-2-tagged erythrocytes and activate complement as well as induce phagocytosis. These *in vitro* observations indicate that naturally acquired antibodies to RAP-2/RSP-2 may play a role in both immunity and pathogenesis during *P. falciparum* infections.

As a result of the hydrophobic nature of the RAP-2/RSP-2 antigen (35,37), it has, until recently, not been possible to produce a recombinant protein that could be used in ELISA for the determinations of antibodies (35). Thus, initially, in our study for the determination of the levels of RAP-2/RSP-2-reactive antibodies, the binding of antibodies to RAP-2/RSP-2-tagged RBCs was analysed by flow cytometry, using serum samples pre-adsorbed on infected RBCs lacking the expression of RAP-2/RSP-2 on their surface (25). All Cameroonian children in this study possessed IgG and IgM serum antibodies reactive with RAP-2/RSP-2 independently of their clinical status. When the antibody levels obtained by FACS were compared with those seen in a conventional ELISA using rRAP-2 as antigen, the group of anaemic children had higher levels of IgG antibodies compared to the nonanaemic ones, while no differences between the two groups were seen for IgM antibodies.

To the best of our knowledge, no previous study has looked at the IgG subclass distribution of anti-RSP-2/

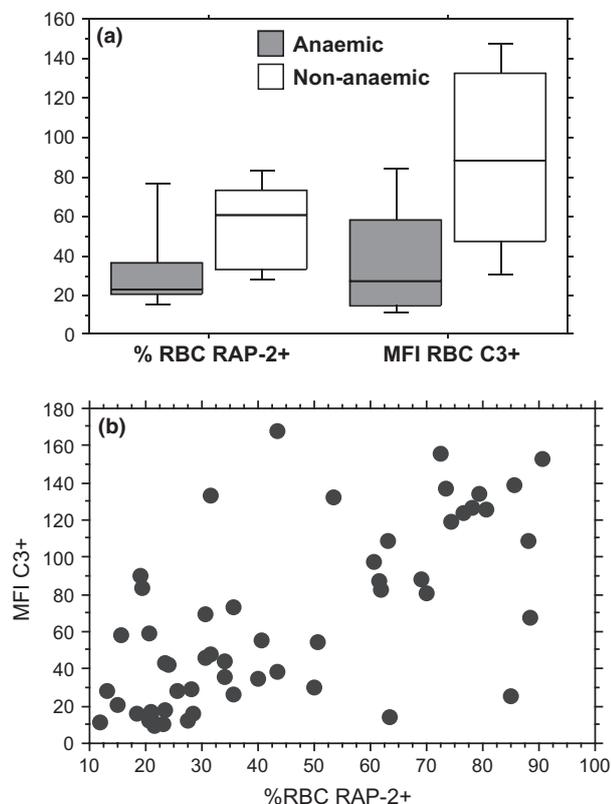


Figure 2 Complement activation in relation to the proportion of RAP-2/RSP-2-positive erythrocytes. (a) The ability of sera to recognize RAP-2/RSP-2 and activate complement was investigated by performing two parallel immunofluorescence assays to determine the levels of complement activation (in terms of RBCs with bound C3: MFI RBC C3+) in relation to the proportion of RAP-2/RSP-2+ RBCs (% RBC RAP-2+). Mouse mAbs B4 was run alongside as an internal control. Mouse Ig2a and Swedish sera served as negative controls. Boxes indicate 25th and 75th percentiles (box) and the median (thick line across each box). Vertical lines indicate highest and lowest values, excluding outliers. (b) Spearman rank correlation of complement activation and the proportion RAP-2+ RBCs. $\rho = 0.64$, $P = 0.0001$.

RAP-2 antibodies in the sera of patients. The present study indicates a bias for IgG3 over IgG1 by flow cytometry among the RAP-2/RSP-2-reactive antibodies in the Cameroonian children. In the FACS analysis, low levels of IgG1 and IgG3 antibodies with a bias for IgG3 over IgG1 were seen among the RAP-2/RSP-2-reactive antibodies, while no IgG2 and IgG4 antibodies were detected. This is probably a reflection of the presence of generally low levels of antibodies to RAP-2/RSP-2 in these individuals. However, it could also, to some extent, be attributable to a low sensitivity of the FACS method when used for antibody determination. This latter fact is strengthened by the fact that in the ELISA, IgG4 levels as well as IgE antibodies could be detected. In the ELISA, there was a bias for

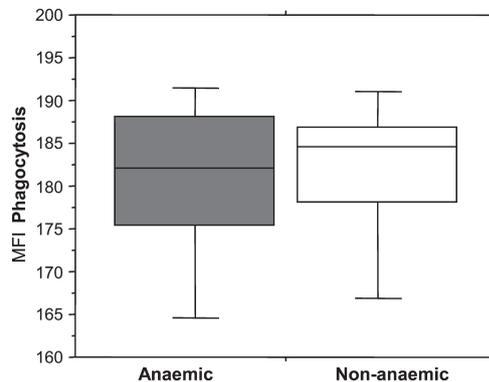


Figure 3 Phagocytosis was analysed by FACS. THP1 monocytic cells were allowed to interact with erythrocytes from malaria-infected cultures stained with FITC and HE and opsonized with human sera. Mouse mAbs B4 was run alongside as an internal control and mouse Ig2a and a pool of Swedish sera served as negative controls. Boxes indicate 25th and 75th percentiles (box) and the median (thick line across each box). Vertical lines indicate highest and lowest values, excluding outliers.

IgE (specific or total) and IgG4 in the nonanaemic individuals, while the anaemic children frequently had higher levels of IgM, IgG, IgG1, -2 and -3. Previous studies of Gambian patients showed that IgG1 was the predominant IgG subclass reacting with recombinant RAP-1, while only few sera contained low levels of IgG2, -3, and -4 antibodies (38).

When the results obtained by the FACS assay were compared with those in the conventional ELISA, there was a significant correlation between the two assays with regard to IgG only in the anaemic individuals, probably reflecting the higher IgG levels in these individuals. This could probably be attributable to differences in the nature of the antigens (recombinant antigen for ELISA vs. antigen on cells in their natural form for FACS) used for detection. It could also be that more epitopes are exposed in the ELISA when the antigen is bound to a solid phase, whereas conformational epitopes may be unavailable for binding when membrane bound in solution by flow cytometry. This difference could probably also reflect difficulties detecting weakly or unevenly labelled RAP-2/RSP-2-tagged erythrocytes by flow cytometry. Nevertheless, both assays could be of relevance for large-scale sero-epidemiological studies of antibody responses as a measure of malaria immunity, wherein the FACS method could present some advantages in terms of speed and efficiency.

In general, the low molecular weight rho-tryptin proteins are of a highly conserved nonpolymorphic nature (39). RAP-2 forms oligomeric complexes with RAP-1 (25,26), and significant cross-reactions have also been observed

between the two antigens. Antibodies induced following immunization of mice with RAP-1 recombinant proteins recognized rRAP-2 and *vice versa* (39,40). However, it is not known to what extent antibodies to these rhoptry antigens induced during natural malaria infections cross-react.

There is paucity of data regarding the dynamics/duration of antibody responses to RAP-2/RSP-2. The low levels of anti-RAP-2 antibodies seen herein are compatible with previous studies, indicating that levels of antibodies to RAP-2 do not reach a maximum until 30 years of age, while the levels of antibodies to RAP-1 increased significantly above 15 years of age (41). Studies in natives of Papua New Guinea showed similar results, where maximum levels of antibodies to both RAP-1 and RAP-2 were not reached until after 30 years of age (42).

In the immunofluorescence assay, all sera tested recognized the surface of RAP-2/RSP-2-tagged erythrocytes with a punctuated staining pattern typical of rhoptry proteins, indicating that the RAP-2/RSP-2 antigen is immunogenic in most individuals during natural infections with *P. falciparum*.

Plasmodium falciparum-reactive antibodies have previously been shown to be associated with immune protection against the asexual blood-stage infection. In areas where malaria is endemic, it is generally accepted that the cytophilic IgG1 and IgG3 subclasses may protect against *P. falciparum* infection, whereas IgG2 and IgG4 are thought to rather interfere with the protective mechanisms of the other isotypes (43–47). The basis for the protection of IgG1 and IgG3 subclass antibody has been attributed to their greater opsonophagocytic activity and their complement activation capacity. Meanwhile, both protective and pathogenic roles have been reported for IgE and IgM antibodies (48).

Although the nonanaemic individuals showed lower IgG antibody levels compared to anaemic individuals, they had a higher proportion of C3-binding erythrocytes, which paralleled the proportion of RAP-2/RSP-2-positive erythrocytes. The nonanaemic individuals also showed a higher tendency for phagocytosis, even though phagocytosis was also frequently seen with the anaemic sera. This may be explained by the fact that the nonanaemic individuals showed higher levels of IgG3 antibodies, which is the most efficient complement activating IgG subclass. Although antibodies of the IgM isotype also seen in these children are not able to serve as opsonins, they may enhance phagocytosis by activating the classical pathway of complement. Studies in humans suggest that the complement system and phagocytosis may be important in the host defence against malaria, although it may also be associated with disease pathology (49). Our results indicate that the effector functions of the RAP-2/RSP-2-reactive

antibodies may be more important than their amounts, and such antibodies may play a role in both immunity and pathogenesis during *P. falciparum* infection, involving mechanisms such as opsono-phagocytosis and complement activation.

A previous study equally suggested that antibodies to the low molecular weight rhoptry proteins generated during parasite infection might have a role in the pathogenesis and/or protection from malarial anaemia (24). Following our observations, it may be that, during infection, highly efficient (high avidity) anti-RAP-2/RSP-2 antibodies inhibit invasion and, together with the phagocytic and/or complement system, control infection by limiting parasite densities through lysis and/or phagocytosis, hence preventing disease progression and the consequent anaemia. Parasite control could probably also be as a result of their splenic clearance as a consequence of RBC membrane rigidification by RAP-2/RSP-2, which has been observed to be amplified by additional antibody tagging (Meher Antia *et al.*, unpublished data). On the other hand, functionally less efficient (low avidity) isotypes at the onset of infection will probably result in anaemia, because there is still a substantial tagging of RBCs by RAP-2/RSP-2, which will eventually be destroyed. A protective role of anti-RAP-2/RSP-2 antibodies is also suggested by previous studies, which showed that monkeys immunized with native or a recombinant form (reduced and denatured) of RAP-1 and RAP-2 produced antisera which recognized the native protein as revealed by indirect immunofluorescence and immunoblotting (50). Monoclonal antibodies directed against RAP-1 and RAP-2 have been shown to provide substantial *in vitro* inhibition of parasite invasion (51). Also, experimental immunization of *Saimiri* monkeys with purified RAP-1 and RAP-2 conferred partial protection against *P. falciparum* infection (28,52). Antibody avidity (functional affinity) is an important feature of the humoral immune response (48,53). This is the measurement of the force between the antigen and the antibody, which can reflect the quality of the antibodies involved in protection or in different phases of disease. Increased avidities and on-rates of antibodies have been postulated to provide increased *in vivo* effectiveness and protection (54). The avidity of antibody–antigen binding has been shown to vary according to the time of infection and the class of antibody produced. Ferreira *et al.* (53) noted a predominance of high-avidity antibodies, particularly IgG1, in clinically immune Senegalese subjects but not Amazonian patients. They further suggested that high-quality anti-*P. falciparum* antibodies initially produced during the intraerythrocytic growth of the parasite are more efficient against the severity of the disease when parasitaemias are still low (53).

The discordance observed wherein lower levels of specific antibodies in the nonanaemic children bind more

RAP-2/RSP-2 RBCs could be explained by our postulation that the binding of high-avidity antibodies in these subjects to RAP-2/RSP-2 would result in the formation of immune complexes. This scenario would probably lead to a decrease in the levels of circulating antibodies following removal of the immune complexes by the spleen. This notion is supported by evidence from a previous study wherein the quantity of antibody produced by malaria-exposed subjects was not seen to be predictive in terms of protection. Despite the presence of high antibody levels, individuals developed a rising parasitaemia accompanied by symptoms (55). Also, children who experienced *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure had significantly lower antibody avidity than did healthy controls, despite having a marked antibody response following infection, suggesting an intrinsic defect in antibody avidity maturation in these subjects leading to disease susceptibility (56).

Taken together, on the basis of the present study, it appears that not only the levels of antibodies, but also their effector functions may be important whether they should be pathogenic or protective. Nevertheless, the antibodies could also be acting in concert with other factors that were not investigated in this study. However, further studies of a longitudinal nature, with a larger study group composed of different ages, are required to further elucidate these findings. In addition, detailed studies on the kinetics of antibodies to RAP-2/RSP-2 and their avidities will be of great importance in understanding the role of such antibodies in protection and or pathogenesis. Because RAP-2/RSP-2 is a suggested vaccine candidate, data presented herein may be of relevance with regard to considerations on the inclusion of RAP-2/RSP-2 as a component of subunit vaccines.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all blood donors who participated in this study. Appreciation goes to Margareta Hagstedt for help with the ELISAs. We thank Jan-Olov Persson of Statistiska forskningsgruppen, Stockholm University, and his student Achilles Tsoumanis for statistical assistance. We are also grateful to Drs. Nnaemeka Iriemenam and Elisabeth Israelsson for their kind contributions. This work is part of the activities of the BioMalPar European Network of Excellence supported by a European grant (LSHP-CT-2004-503578) from the Priority 1 "Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health" in the 6th Framework Programme. In addition, this work was partly supported by grants from the Swedish Agency for Research Development with Developing Countries (SIDA/SAREC) and the Swedish Medical Research Council (VR).

REFERENCES

- Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **64**: 1–11.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K & Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; **415**: 673–679.
- Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, *et al.* Malaria and the red cell. *Hematol* 2002; 35–57.
- Schofield L & Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2005; **9**: 722–735.
- World Health Organization. Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; **94**: 51–90.
- Greenwood B & Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature* 2002; **415**: 670–672.
- Good MF, Xu H, Wykes M & Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 69–99.
- Abdalla S, Weatherall DJ, Wickramasinghe SN & Hughes M. The anaemia of *P. falciparum* malaria. *Br J Haematol* 1980; **46**: 171–183.
- Weatherall DJ & Abdalla S. The anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Br Med Bull* 1982; **38**: 147–152.
- Phillips RE & Pasvol G. Anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Baillieres Clin Haematol* 1992; **5**: 315–330.
- Camacho LH, Gordeuk VR, Wilairatana P, Pootrakul P, Brittenham GM & Looareesuwan S. The course of anaemia after the treatment of acute, falciparum malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; **92**: 525–537.
- Kurtzals JA, Addae MM, Akanmori BD, *et al.* Anaemia caused by asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune African schoolchildren. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; **93**: 623–627.
- McElroy PD, ter Kuile FO, Lal AA, *et al.* Effect of *Plasmodium falciparum* parasitemia density on hemoglobin concentrations among full-term, normal birth weight children in western Kenya. IV. The Asembo Bay Cohort Project. *Am J Trop Med Hyg* 2000; **62**: 504–512.
- Price RN, Simpson JA, Nosten F, *et al.* Factors contributing to anaemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **65**: 614–622.
- Menendez C, Fleming AF & Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 2000; **16**: 469–476.
- Looareesuwan S, Merry AH, Phillips RE, *et al.* Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. *Br J Haematol* 1987; **67**: 473–478.
- Layez C, Nogueira P, Combes V, *et al.* *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* 2005; **106**: 3632–3638.
- Evans KJ, Hansen DS, van Rooijen N, Buckingham LA & Schofield L. Severe malarial anaemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* 2006; **107**: 1192–1199.
- Casals-Pascual C & Roberts DJ. Severe malarial anaemia. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 155–168.
- Awah NW, Troye-Blomberg M, Berzins K & Gysin J. Mechanisms of malarial anaemia: potential involvement of the *Plasmodium falciparum* low molecular weight rhoptry-associated proteins. *Acta Trop* 2009; **112**: 295–302.
- Facer CA. Direct antiglobulin reactions in Gambian children with *P. falciparum* malaria. III. Expression of IgG subclass

- determinants and genetic markers and association with anaemia. *Clin Exp Immunol* 1980; **41**: 81–90.
- 22 Facer CA. Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. II. Specificity of erythrocyte-bound IgG. *Clin Exp Immunol* 1980; **39**: 279–288.
 - 23 Craig A & Scherf A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol* 2001; **115**: 129–143.
 - 24 Sterkers Y, Scheidig C, da Rocha M, Lepolard C, Gysin J & Scherf A. Members of the low-molecular-mass rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* bind to the surface of normal erythrocytes. *J Infect Dis* 2007; **196**: 617–621.
 - 25 Baldi DL, Andrews KT, Waller RF, et al. RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* 2000; **19**: 2435–2443.
 - 26 Baldi DL, Good R, Duraisingh MT, Crabb BS & Cowman AF. Identification and disruption of the gene encoding the third member of the low-molecular-mass rhoptry complex in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2002; **70**: 5236–5245.
 - 27 Douki JL, Sterkers Y, Lepolard C, et al. Adhesion of normal and *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes to endothelial cells and the placenta involves the rhoptry-derived ring surface protein-2. *Blood* 2003; **101**: 5025–5032.
 - 28 Perrin LH, Merkli B, Gabra MS, Stocker JW, Chizzolini C & Richie R. Immunization with a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen induces a partial immunity in monkeys. *J Clin Invest* 1985; **75**: 1718–1721.
 - 29 Gysin J, Pouvelle B, Fievet N, Scherf A & Lepolard C. Ex vivo desequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from human placenta by chondroitin sulfate A. *Infect Immun* 1999; **67**: 6596–6602.
 - 30 Trager W & Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; **193**: 673–675.
 - 31 Lelièvre J, Berry A & Benoit-Vical F. An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization. *Exp Parasitol* 2005; **109**: 195–197.
 - 32 Wanji S, Tanke T, Atanga SN, Ajonina C, Nicolas T & Fontenille D. Anopheles species of the Mount Cameroon region; biting habits, feeding behaviour and entomological inoculation rates. *Trop Med Int Health* 2003; **8**: 643–649.
 - 33 Nkwo-Akenji TK, Ntonifor NN, Ching JK, et al. Evaluating a malaria intervention strategy using knowledge, practices and coverage surveys in rural Bolifamba, Southwest Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; **99**: 325–332.
 - 34 Achidi EA, Apinjoh TO, Mbunwe E, et al. Febrile status, malaria parasitaemia and gastrointestinal helminthiasis in school children resident at different altitudes. *Ann Trop Med Parasitol* 2008; **102**: 103–118.
 - 35 Mariuba LA, Orlandi PP, Medeiros M, Holanda R, Grava A & Nogueira PA. Improving the production of the denatured recombinant N-terminal domain of rhoptry-associated protein 2 from a *Plasmodium falciparum* target in the pathology of anaemia in falciparum malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103**: 522–527.
 - 36 Tippett E, Fernandes LA, Rogerson SJ & Jaworowski A. A novel flow cytometric phagocytosis assay of malaria-infected erythrocytes. *J Immunol Methods* 2007; **325**: 42–50.
 - 37 Saul A, Cooper J, Hauquitz D, et al. The 42-kilodalton rhoptry-associated protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; **50**: 139–149.
 - 38 Fonjungo PN, Stuber D & McBride JS. Antigenicity of recombinant proteins derived from rhoptry-associated protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 1998; **66**: 1037–1044.
 - 39 Stowers AW, Cooper JA, Ehrhardt T & Saul A. A peptide derived from a B cell epitope of *Plasmodium falciparum* rhoptry associated protein 2 specifically raises antibodies to rhoptry associated protein 1. *Mol Biochem Parasitol* 1996; **82**: 167–180.
 - 40 Stowers AW, Spring KJ & Saul A. Preparative scale purification of recombinant proteins to clinical grade by isotachopheresis. *Biotechnol* 1995; **13**: 1498–1503.
 - 41 Johnson A, Leke R, Harun L, et al. Interaction of HLA and age on levels of antibody to *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated proteins 1 and 2. *Infect Immun* 2000; **68**: 2231–2236.
 - 42 Stowers A, Taylor D, Prescott N, Cheng Q, Cooper J & Saul A. Assessment of the humoral immune response against *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated proteins 1 and 2. *Infect Immun* 1997; **65**: 2329–2338.
 - 43 Warmerdam PA, van deWinkel JG, Vlug A, Westerdaal NA & Capel PJ. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol* 1991; **147**: 1338–1343.
 - 44 Wipasa J, Elliott S, Xu H & Good MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunol Cell Biol* 2002; **80**: 401–414.
 - 45 Garraud O, Perraut R, Riveau G & Nutman TB. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. *Trends Parasitol* 2003; **19**: 300–304.
 - 46 Tangteerawatana P, Montgomery SM, Perlmann H, Looareesuwan S, Troye-Blomberg M & Khushmith S. Differential regulation of IgG subclasses and IgE antimalarial antibody responses in complicated and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunol* 2007; **29**: 475–483.
 - 47 Bouharoun-Tayoun H & Druilhe P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; **87**: 229–234.
 - 48 Leoratti FMS, Durlacher RR, Lacerda MVG, et al. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malar J* 2008; **7**: 186–196.
 - 49 Chang KH & Stevenson MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol* 2004; **34**: 1501–1516.
 - 50 Collins WE, Walduck A, Sullivan JS, et al. Efficacy of vaccines containing rhoptry-associated proteins RAP1 and RAP2 of *Plasmodium falciparum* in *Saimiri boliviensis* monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 2000; **62**: 466–479.
 - 51 Harnyuttanakorn P, McBride JS, Donachie S, Heidrich H-G & Ridley RG. Inhibitory monoclonal antibodies recognise epitopes adjacent to a proteolytic cleavage site on the RAP1 protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; **55**: 177–186.
 - 52 Ridley RG, Takacs B, Etlinger HH & Scaife JG. A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* is protective in *Saimiri* monkeys. *Parasitol* 1990; **101**: 187–192.
 - 53 Ferreira MU, Kimura EAS, Souza JM & Katzin AM. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. *Am J Trop Med Hyg* 1996; **55**: 315–323.

- 54 Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, *et al.* The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 1997; **276**: 2024–2027.
- 55 Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajsiddhi T & Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro*, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 1990; **172**: 1633–1641.
- 56 Lee YC, Kelly DF, Yu LM, *et al.* *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure in children is associated with inadequate production of high-quality antibody. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 186–192.