

2.13.01 - Parasitologia / Protozoologia de Parasitos

PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DA PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS DE *Plasmodium vivax* COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES ESPECÍFICOS PARA DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA VIVAXLetícia R. Cussat^{1*}, Gustavo P. C. de Oliveira¹, Aline M. Miranda¹, Érika M. Braga²¹ Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)² Professora da UFMG- Departamento de Parasitologia/ Orientadora**Resumo**

A malária humana é uma doença causada por protozoários parasitos do gênero *Plasmodium* e transmitida por fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo considerada um grande problema de saúde pública em nível mundial. Por esta razão, um diagnóstico eficiente e tratamento rápido são necessários para o controle da doença. No entanto, os testes de diagnóstico atualmente disponíveis apresentam limitações, principalmente quando se trata de infecções por *Plasmodium vivax*, a principal espécie causadora de malária no Brasil. Desta forma, nosso objetivo foi selecionar e avaliar o potencial diagnóstico de 580 peptídeos derivados da proteína 1 de superfície de merozoíto de *P. vivax* (PvMSP-1), uma molécula envolvida na invasão dos eritrócitos. Dois desses peptídeos sintéticos, p70 e p314, foram detectados exclusivamente por anticorpos IgG presentes em soros de pacientes infectados com *P. vivax*, não sendo reconhecidos por anticorpos de pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* ou indivíduos saudáveis, nunca expostos à transmissão da doença. Nossos resultados indicam que p70 e p314 podem constituir futuros biomarcadores específicos para diagnóstico de malária vivax em áreas de transmissão de malária.

Palavras-chave: PvMSP-1; Infecção; Sorologia**Apoio financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG**Trabalho selecionado para a JNIC:** UFMG**Introdução**

A malária humana é uma doença causada por protozoários parasitos do gênero *Plasmodium* e transmitida por fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* e é considerada um problema de saúde pública mundial, especialmente em países periféricos e em desenvolvimento. Devido à sua alta taxa de morbidade e mortalidade, principalmente entre crianças com menos de 5 anos de idade no continente africano, é necessário um diagnóstico eficiente aliado à um tratamento rápido para o sucesso do controle da doença (WHO, 2020).

O exame microscópico de gota espessa é considerado o teste padrão-ouro para o diagnóstico da malária sendo capaz de determinar a espécie de *Plasmodium* envolvida na infecção. Entretanto, fatores como a experiência do microscopista, qualidade das lâminas e a falta de conhecimento sobre a doença fora de áreas endêmicas, podem dificultar o sucesso do diagnóstico e a implementação de um tratamento imediato ou mesmo de medidas de controle (WHO, 2020). Uma alternativa existente são os Testes de Diagnóstico Rápido (RDTs), desenvolvidos para serem opções mais rápidas, fáceis e de baixo custo, principalmente em áreas endêmicas de difícil acesso (Martha et al., 2013a,b). Mas, estes possuem algumas limitações como a não detecção precisa da espécie causadora da infecção (Mukkala et al., 2018).

Nesse sentido, a busca de potenciais alvos diagnósticos baseados em proteínas específicas de cada espécie de *Plasmodium* tem sido preconizada na tentativa de otimizar o diagnóstico de malária e assim garantir a rápida implementação de medidas de controle. Uma molécula amplamente estudada é a proteína 1 de superfície de merozoítos (MSP-1), que participa do processo de invasão dos eritrócitos (Holder & Freeman, 1982). Estudos anteriores já demonstraram que essa proteína é capaz de gerar uma resposta altamente imunogênica em humanos e de estimular a produção de anticorpos capazes de bloquear a invasão dos merozoítos induzindo a produção de anticorpos protetores (Soares et al., 1997; Braga et al., 2002; Ladeia-Andrade et al., 2007; Follegatti et al., 2017). Esses dados evidenciam o potencial vacinal e um promissor marcador sorológico de infecção e exposição desta proteína.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi demonstrar, por meio da técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA), que dois peptídeos, p70 e p314, provenientes da PvMSP-1, analisados anteriormente pela técnica de *spot-synthesis* e reconhecidos exclusivamente por anticorpos presentes no plasma de pacientes infectados por *P. vivax*, podem vir a serem utilizados em testes sorológicos para validação como alvos para comporem kits de

diagnóstico para identificação de infecções por *P. vivax*.

Metodologia

Nesse estudo foram utilizados plasmas de pacientes infectados por *P. vivax* (n= 191), *P. falciparum* (n= 10) oriundos de três áreas endêmicas do Brasil e como grupo controle, indivíduos nunca expostos à malária que vivem em área não endêmica no Brasil (n= 65).

Inicialmente, a técnica de *spot-synthesis* foi realizada para produzir uma membrana contendo 580 peptídeos que correspondem na sequência total de aminoácidos da PvMSP-1 da cepa Sal I (Del Potillo et al., 1991; Putaporntip et al., 2002). Os peptídeos foram utilizados em um mapeamento de epítomos com objetivo de detecção de sequências imunodominantes e, posteriormente foram identificados dois peptídeos, p70 e p314, com alta reatividade e seletividade para anticorpos de pacientes infectados por *P. vivax* (Oliveira, 2013; Oliveira, 2019). A fim de dosar anticorpos IgG contra ambos os peptídeos, realizamos um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Após padronização, cada poço da placa foi revestido com 2 ng/μL de cada peptídeo em tampão de bicarbonato-carbonato (pH 9,6; 0,1 M) e incubado *overnight* a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) contendo 0,05% de Tween (PBST) por 4 vezes. As placas foram bloqueadas usando a solução de albumina sérica bovina (BSA) 1% (w/v) em PBST e mantidas a 4 °C *overnight*. A seguir, as placas foram lavadas e o plasma dos indivíduos dos grupos testados foram diluídos 1:50 em PBST 0,05% contendo 0,1% de BSA, adicionadas aos poços e incubadas a 37 °C por 2 horas. As placas foram novamente lavadas e IgG anti-humano conjugado com peroxidase, diluído 1:2000 em PBST 0,05% com 0,1% BSA foi adicionado aos poços e incubado por 90 minutos a 37°C. Por fim, para que a ligação entre os anticorpos dos indivíduos e o anticorpo secundário fosse revelada, usou-se 0,5 mg/mL de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) diluído em 0,05 M de tampão fosfato-citrato, pH 5,0 e, após 10 minutos de incubação a 37°C a reação foi interrompida com H₂SO₄ 4 N. A densidade óptica (DO 492 nm) foi determinada em um espectrofotômetro de microplaca Multiskan GO (Thermo Scientific).

Os dados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, EUA). Para testar se os dados possuem uma distribuição Gaussiana, utilizamos o teste de D'Agostino-Pearson. As comparações entre dois grupos foram analisadas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney e para comparações entre três ou mais grupos, utilizamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. Para analisar associações entre duas variáveis foi realizado o teste de correlação de Spearman. Análise de curva de característica de operação do receptor (ROC) foi usada para determinar o limiar de positividade (valores de corte), que foi definido como o ponto na curva ROC onde a sensibilidade e especificidade do teste estavam mais próximas. Os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

Os resultados do teste de ELISA demonstraram que a relação entre os níveis de IgG contra p70 e p314 foi significativamente maior em indivíduos infectados com *P. vivax* do que em pacientes infectados com *P. falciparum* e indivíduos saudáveis nunca expostos à malária (**Figura 1A e 1B**). Para avaliar se as condições de transmissão de malária interfeririam no reconhecimento dos anticorpos, avaliamos a resposta de anticorpos IgG em pacientes de três áreas endêmicas distintas no Brasil (Cuiabá, Manaus e Porto Velho) e observamos que não houve diferença significativa entre as localidades (**Figura 1C**).

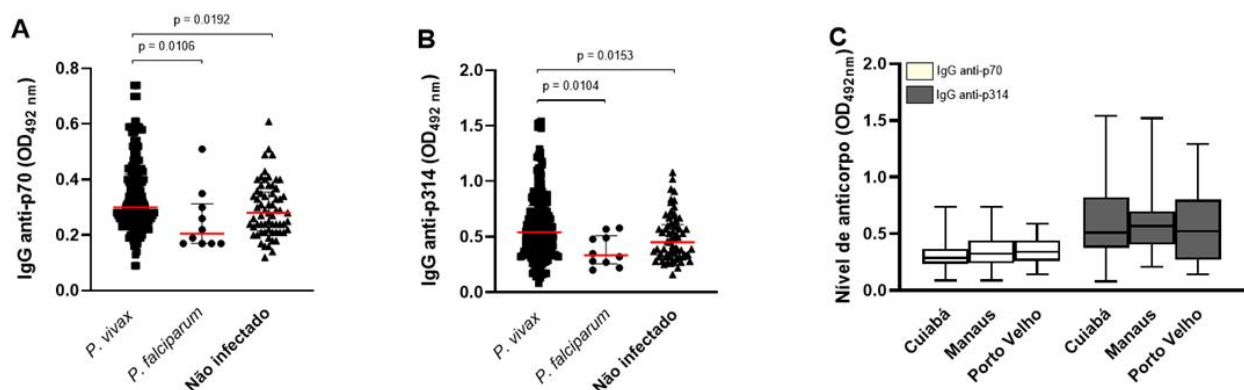


Figura 1. Níveis de IgG contra os peptídeos p70 e p314 nos grupos estudados e em três áreas endêmicas de malária no Brasil.

Além disso, avaliou-se a associação entre resposta de anticorpos contra p70 e p314 e parasitemia, constatando que existe uma correlação positiva entre os níveis de IgG contra os peptídeos e a parasitemia (**Figura 2A, B**).

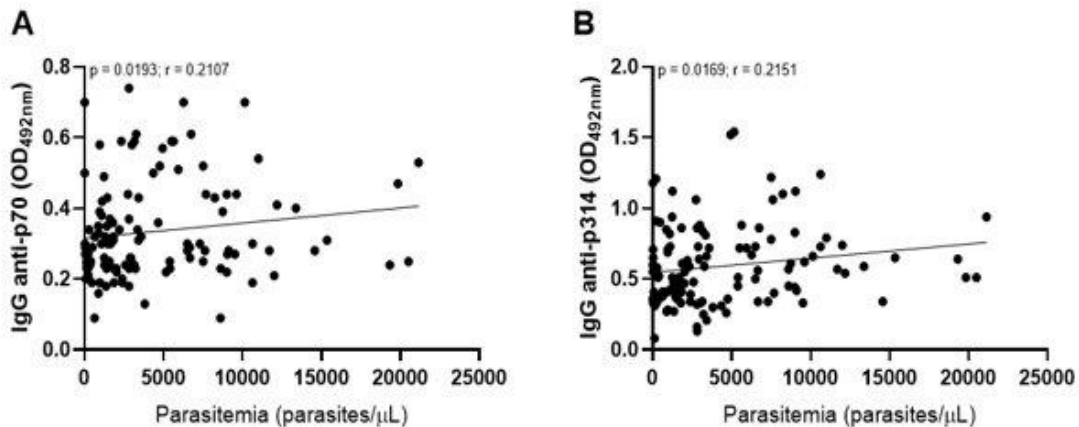


Figura 2. Associação entre parasitemia e níveis de anticorpos contra p70 e p314.

Por fim, para avaliar o desempenho de cada peptídeo (eficácia, sensibilidade, especificidade) foram feitas curvas ROC e visto que ambos peptídeos apresentam desempenhos próximos, sem diferenças entre indivíduos infectados e não infectados (**Figura 3B, D**) e também de infecção por *P. vivax* de *P. falciparum* (**Figura 3A, C**). Esses dados apontam que, apesar de pacientes infectados exibirem maiores níveis de anticorpos contra p314, o desempenho dos peptídeos é semelhante, indicando que ambos os antígenos podem constituir importantes alvos diagnósticos de infecções ativas por *P. vivax*.

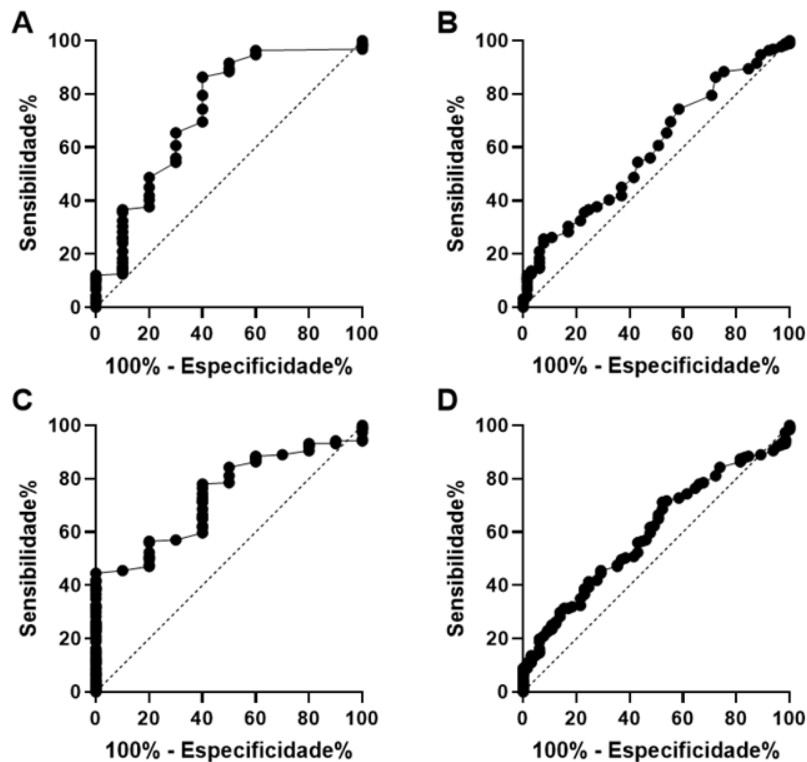


Figura 3. Eficácia, sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA contra p70 e p314. Gráfico A, p70: AUC= 0,7356; Sensibilidade= 86,4; Especificidade= 60; ValorP= 0,0121. Gráfico B, p70: AUC= 0,5970; Sensibilidade= 56; Especificidade= 52,3; ValorP= 0,0195. Gráfico C, p314: AUC= 0,7361; Sensibilidade= 78,1; Especificidade= 60; ValorP= 0,0119. Gráfico D, p314: AUC= 0,6005; Sensibilidade= 61,8; Especificidade= 52,3; Valor p= 0,0155.

Conclusões

- *P. vivax* é a espécie mais prevalente de parasitos da malária humana no mundo, inclusive no Brasil, por isso métodos diagnósticos específicos e alternativos aos atualmente utilizados, se fazem necessários.
- Dois peptídeos, p70 e p314 da proteína majoritária na superfície de merozoítos de *P. vivax* (PvMSP1) compreendem potenciais biomarcadores de infecção por esta espécie, podendo ser utilizados em testes sorológicos em áreas endêmicas de malária.
- Deve-se considerar que para uso em larga escala, esses potenciais biomarcadores necessitam de ampla validação, incluindo o desenvolvimento de ensaios clínicos, estudos amplos para testar e determinar a sensibilidade e especificidade.

Referências bibliográficas

- BRAGA EM, BARROS RM, REIS TA, FONTES CJF, MORAIS CG, MARTINS MS, et al. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kDa) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 66(5):461-466.
- CASSIANO GC, FURINI AAC, CAPOBIANCO MP, STORTI-MELO LM, ALMEIDA ME, BARBOSA DRL, et al. Immunogenetic markers associated with naturally acquired humoral immune response against a N-terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). *Malaria Journal* 2016; 15:306.
- DEL PORTILLO HA, LONGACRE S, KHOURI E, DAVID PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991; 88:4030-4034.
- FOLEGATTI PM, SIQUEIRA AM, MONTEIRO WM, LACERDA MVG, DRAKELEY CJ, BRAGA EM. A systematic review on malária sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malaria Journal* 2017; 16:107
- HOLDER AA, FREEMAN RR. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1982; 156:1528-1538.
- LADEIA-ANDRADE S, FERREIRA MU, SCOPEL KKG, BRAGA EM, BASTOS MS, WUNDERLICH G, et al. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1₁₉ and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 102(8):945-951.
- MARTHA J, GILLET P, JACOBS JJ. Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clinical Microbiology Infections* 2013a; 19(5):399-407.
- MARTHA J, GILLET P, JACOBS JJ. Malaria rapid diagnostic tests in travel medicine. *Clinical Microbiology Infections* 2013b; 19(5):408-415.
- MUKKALA AN, KWAN J, LAU R, HARRIS D, KAIN D, BOGGILD AK. An update on malaria rapid diagnostic tests. *Current Infectious Diseases Reports* 2018; 20:49.
- PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S, SAKIHAMA N, FERREIRA MU, KHO W-G, KANEKO A, et al. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99(25):16348-16353.
- OLIVEIRA IC. Identificação de determinantes antigênicos da proteína 1 da superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP1) como potenciais biomarcadores de anemia. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.
- OLIVEIRA GPC. Peptídeo sintético derivado da proteína 1 da superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) como potencial biomarcador de malária vivax. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2019.
- SOARES IS, LEVITUS G, SOUZA JM, DEL PORTILLO HA, RODRIGUES MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infection and Immunity* 1997; 65(5):1606-1614.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2020. <www.who.int/malaria>.