

## **A proteína principal da superfície de merozoítos (MSP-1) de *Plasmodium falciparum*: diversidade alélica e reconhecimento imune**

Considera-se atualmente a proteína principal de merozoítos (*merozoite surface protein-1* ou MSP-1) de *Plasmodium falciparum* um dos principais antígenos de fase assexuada sangüínea, mas seu extenso polimorfismo pode comprometer seu uso em vacinas antimaláricas. Este trabalho examina os padrões de diversidade alélica do gene que codifica a MSP-1 em isolados de pacientes sintomáticos provenientes de três regiões malarígenas: uma área hipoendêmica no sudoeste da Amazônia brasileira (n = 54), uma área mesoendêmica no sul do Vietnã (n = 238) e uma área holoendêmica no norte da Tanzânia (n = 79). Amplificaram-se fragmentos dos blocos variáveis 2, 4a, 4b e 6 ou 10 desse gene de cópia única através de reação de polimerase em cadeia (PCR). Vinte e quatro tipos principais de MSP-1 foram definidos como combinações únicas de formas alélicas em cada bloco variável. Desses, 10 diferentes tipos de MSP-1 foram identificados no Brasil, 23 no Vietnã e 13 na Tanzânia. A proporção de infecções geneticamente mistas (ou seja: pacientes infectados com populações de parasitas que expressam mais de um tipo de MSP-1) variou de 39% no Brasil, 44% no Vietnã a 60% na Tanzânia. A vasta maioria (90%) dos parasitas do Brasil e da Tanzânia pertenciam a um dos sete tipos de MSP-1 mais comuns. Em contraste, esses mesmos tipos de MSP-1 foram encontrados em apenas 61% dos isolados do Vietnã.

A recombinação intragênica entre os blocos 4a e 6 em isolados do Vietnã, mas não entre os isolados do Brasil e da Tanzânia, foi significativamente menos freqüente que esperado de associação aleatória entre as formas alélicas nesses blocos variáveis. Observou-se o mesmo padrão em dois estudos independentes em 1994 e 1996. Esses dados, em conjunto com outros relatos prévios, sugerem que alguns tipos de MSP-1 possam estar sob pressão

## **The merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*: allelic diversity and immune recognition**

The merozoite surface protein-1 (MSP-1) locus of *Plasmodium falciparum* codes for a major asexual blood-stage antigen currently considered as a strong vaccine candidate. The protein, however, shows extensive polymorphism which may compromise its use in subunit vaccines. Here the extent of allelic diversity at the MSP-1 locus was examined in isolates collected from symptomatic patients living in three different malarious regions: the hypoendemic Southwestern Brazilian Amazon (n = 54), the mesoendemic Southern Vietnam (n = 238) and the holoendemic Northern Tanzania (n = 79). Fragments of the variable blocks 2, 4a, 4b and 6 or 10 of this single-copy gene were amplified by polymerase chain reaction, and 24 MSP-1 types were defined as unique combinations of allelic types in each variable block. Ten different MSP-1 types were identified in Brazil, 23 in Vietnam and 13 in Tanzania. The proportion of genetically mixed infections (that is, patients with parasites expressing more than one MSP-1 type) varied from 39% in Brazil, 44% in Vietnam to 60% in Tanzania. The vast majority (90%) of the parasites in Brazil and Tanzania belonged to the same seven most frequent MSP-1 gene types. In contrast, these gene types were found in only 61% of the isolates from Vietnam.

Recombination between blocks 4a and 6 among isolates from Vietnam, but not in those from Brazil and Tanzania, was significantly less frequent than expected from random association of allelic types in these variable blocks. The same pattern was observed in two independent studies in 1994 and 1996. These results, as well as other previously reported data, suggest that some MSP-1 gene types may be under selective pressure in natural parasite populations. The frequency of MSP-1 gene types, however, was similar among isolates collected between 1994 and 1996. Furthermore, the prevalence of the

seletiva em populações naturais de parasitas. A frequência dos tipos de MSP-1, todavia, foi semelhante em isolados colhidos no Vietnã entre os anos de 1994 e 1996. Além disso, a prevalência dos tipos mais comuns e o número médio de tipos de MSP-1 por paciente não diminuiu com a idade nessa região. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a seleção dependente de frequência não é o mecanismo seletivo predominante e indicam a presença de mecanismos seletivos alternativos nessa população do Vietnã — por exemplo: seleção dependente de melhor adaptação funcional dos parasitas às hemácias dos hospedeiros.

A distribuição de tipos de MSP-1 por hospedeiro na Tanzânia, mas não no Brasil e no Vietnã, desvia-se de modo significativo da esperada segundo a hipótese de transmissão independente de cada tipo. Esses achados sugerem que pelo menos algumas das infecções geneticamente mistas na Tanzânia possam ter originado de inoculações únicas de mosquitos que albergavam parasitas geneticamente heterogêneos, em vez de duas ou mais inoculações independentes de populações geneticamente homogêneas de *P. falciparum*.

Propõe-se recentemente que os anticorpos citofílicos de subclasses IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> de alta avididade sejam essenciais em mecanismos de proteção naturalmente adquirida contra estágios assexuados sangüíneos de *P. falciparum* dependentes de monócitos e macrófagos. Comparam-se neste estudo perfis de subclasses de IgG em anticorpos naturalmente adquiridos contra domínios amino-terminais conservados (M3) e variáveis (M6 e F4) da MSP-1 em adultos senegaleses assintomáticos clinicamente imunes e em pacientes amazônicos semi-imunes. Os pacientes amazônicos foram estudados durante um episódio malárico agudo e sintomático por *P. falciparum*, e alguns deles forneceram uma segunda amostra sérica dois meses depois de receberem tratamento eficaz, na ausência de recrudescência ou reinfeção. Os resultados resumem-se do seguinte modo: a) as subclasses citofílicas predominam na maior parte dos indivíduos, mas a magnitude de respostas IgG<sub>3</sub> é maior entre os africanos e, entre os pacientes amazônicos, associa-se com os níveis prévios de exposição à malária; b) as respostas de anticorpos citofílicos, e especialmente de IgG<sub>3</sub>, têm curta duração entre os pacientes

most common gene types and the average number of different gene types harbored by the same patient did not decrease with age in this region. This argues against the prominence of frequency-dependent immune selection of MSP-1 polymorphisms, and indicate that alternative selective mechanisms (such as an increased fitness to the host blood cells) may affect the parasite population from Vietnam.

The distribution of MSP-1 gene types per host in Tanzania, but not in Brazil and Vietnam, significantly deviates from that expected under the hypothesis of independent transmission of each gene type. This suggests that at least some of the genetically mixed infections in Tanzania may have been originated from single mosquito inoculations with multiple-clone parasites, rather than several independent single-clone inoculations.

A critical role has recently been proposed for high-avidity cytophilic IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> subclass antibodies and monocytes and macrophages in naturally acquired protection against *P. falciparum* asexual blood stages. The IgG subclass composition of naturally acquired antibody responses against conserved (M3) and variable (M6 and F4) amino-terminal recombinant fragments of the merozoite surface protein-1 was compared in clinically immune, asymptomatic Senegalese adults and semi-immune adult Amazonian patients. All Amazonian patients were investigated during an acute symptomatic *P. falciparum* attack, and some of them provided a second serum sample two months after effective chemotherapy, in the absence of parasite recrudescence or reinfection. The results may be summarized as follows: a) cytophilic IgG subclasses were shown to predominate in antibody responses in most subjects, but the magnitude of IgG<sub>3</sub> responses was increased in Africans, and was associated with the levels of past malaria exposure among acutely infected Amazonians, b) cytophilic antibodies, and especially IgG<sub>3</sub> responses, are short-lived among semi-immune Amazonians in the absence of re-exposure to the parasite, and c) antibody responses predominate against variable regions and are allelic type-specific. These results are discussed in relation to the possible inclusion of MSP-1-derived peptides in subunit malaria vaccines.

amazônicos na ausência de re-exposição ao parasita, e c) as respostas de anticorpos predominam contra regiões variáveis e são específicas para cada forma alélica. Discutem-se esses resultados em relação ao possível uso de peptídios derivados da MSP-1 em vacinas

*Marcelo Urbano Ferreira*

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade de São Paulo para obtenção  
do Título de Doutor  
São Paulo, SP, Brasil, 1997.