



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

NAJARA CARNEIRO BITTENCOURT

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NATURALMENTE ADQUIRIDA E
LONGEVIDADE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS CONTRA POTENCIAIS
CANDIDATOS VACINAIS DE *Plasmodium vivax*

EVALUATION OF NATURALLY ACQUIRED IMMUNE RESPONSE AND LONGEVITY
OF ANTIBODY RESPONSE AGAINST POTENTIAL *Plasmodium vivax* VACCINE
CANDIDATES

CAMPINAS

2023

NAJARA CARNEIRO BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NATURALMENTE ADQUIRIDA E
LONGEVIDADE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS CONTRA POTENCIAIS
CANDIDATOS VACINAIS DE *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na Área de imunologia.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology in the area of immunology.

Orientador: Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa
Coorientadora: Dra. Letusa Albrecht

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA NAJARA CARNEIRO BITTENCOURT, ORIENTADA PELO PROF. DR. FABIO TRINDADE MARANHÃO COSTA E PELA PROFA. DRA. LETUSA ALBRECHT.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B548a Bittencourt, Najara Carneiro, 1990-
Avaliação da resposta imune naturalmente adquirida e longevidade da resposta de anticorpos contra potenciais candidatos vacinais de *Plasmodium vivax* / Najara Carneiro Bittencourt. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa.

Coorientador: Letusa Ibrecht.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Malária. 2. *Plasmodium vivax*. 3. Antígenos. 4. Imunidade humoral. 5. Memória imunológica. I. Costa, Fabio Trindade Maranhão, 1972-. II. Albrecht, Letusa, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of naturally acquired immune response and longevity of antibody response against potential *Plasmodium vivax* vaccine candidates

Palavras-chave em inglês:

Malaria

Plasmodium vivax

Antígenos

Humoral immunity

Immunologic memory

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabio Trindade Maranhão Costa [Orientador]

Eduardo Lani Volpe da Silveira

Cristiana Ferreira Alves de Brito

Fernanda Janku Cabral

Renata Sesti Costa

Data de defesa: 29-06-2023

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2914-9680>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4163826531885987>

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira

Profa. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Profa. Dra. Fernanda Janku Cabral

Dra. Renata Sesti Costa

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade;

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais Neusa (*in memoriam*) e Adilmar, meus maiores exemplos na vida, que sempre me ensinaram, guiaram e acreditaram em mim e na minha trajetória. Aos meus irmãos Maíra e Allan que mesmo distantes sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Ao meu noivo Ricardo pela compreensão e apoio incondicional.

Ao professor Fabio Costa pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa desde 2015 e por todo o suporte que permitiu que esse trabalho fosse possível. Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Tropicais, Tatyana, João Conrado, Letícia, Gustavo, Ana Carolina, Luís, Liam, Juliana e Carla que contribuíram direta ou indiretamente neste e em outros projetos. Vocês foram essenciais nessa trajetória e se tornaram a minha família em Campinas.

À professora Letusa Albrecht, que é meu grande exemplo de profissional, agradeço pela orientação durante os últimos oito anos, por ter me acolhido em sua casa durante as inúmeras idas a Curitiba e, acima de tudo, agradeço a sua amizade!

Aos queridos colegas do Laboratório de Pesquisa em Apicomplexas do ICC-Fiocruz/PR, por todos os anos de convivência, em especial ao Mario, Rafael, Ana Paula, Beatriz e Ize que tiveram papel fundamental na realização deste trabalho. Aos pesquisadores do ICC e funcionários das plataformas de citometria e microscopia que de alguma forma contribuíram na execução dos ensaios, em especial ao Allan e Rodrigo que auxiliaram nas análises por citometria de fluxo.

Aos colaboradores da Fundação de Medicina Tropical, em especial ao Dr. Marcus Lacerda e à Dra. Stefanie Lopes que me deram todo o suporte necessário em Manaus. À equipe de microscopia diagnóstica pela parceria e empenho diários. Aos colegas de laboratório que tive o prazer de conhecer, conviver e trabalhar em Manaus, em especial à Dayanne e Camila.

Aos pacientes que participaram deste estudo, por acreditarem e confiarem neste trabalho e na ciência. Vocês foram essenciais para a obtenção destes achados.

À Universidade Estadual de Campinas, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos

A todos o meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A malária é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. No Brasil, o principal agente etiológico é o protozoário *Plasmodium vivax*. A malária vivax é raramente letal, mas tem um grande impacto na qualidade de vida das populações em áreas endêmicas. Além disso, as medidas de controle e tratamento da doença não são totalmente eficazes, por isso a busca de métodos de controle alternativos, como uma vacina eficiente, é uma necessidade atual e urgente. Indivíduos naturalmente expostos à malária desenvolvem graus de imunidade. A compreensão da imunidade naturalmente adquirida e da memória imunológica são essenciais para o desenvolvimento de uma vacina. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as células B de memória e avaliar a resposta imune humoral naturalmente adquirida contra potenciais antígenos vacinais em indivíduos expostos à infecção por *Plasmodium vivax* residentes de regiões endêmicas brasileiras. O primeiro capítulo deste trabalho elucida aspectos da diversidade genética de um dos principais candidatos vacinais contra a malária vivax, o antígeno PvAMA1. Observou-se em isolados de *P. vivax* de uma região endêmica brasileira a presença de 19 haplótipos de PvAMA1. Dois destes haplótipos foram selecionados e expressos como proteínas recombinantes PvAMA1V5 e PvAMA1V16. A resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra elas foi quantificada em indivíduos de duas regiões endêmicas distintas. Foram observados anticorpos contra ambas as proteínas tanto em indivíduos com malária aguda quanto em indivíduos com histórico de malária vivax, o que mostra que existe longevidade na resposta imune humoral contra estes antígenos. O segundo capítulo tem enfoque na caracterização mais aprofundada da resposta de anticorpos IgG e IgM naturalmente adquiridos ao longo do tempo e do perfil de células B de memória. Para isso, indivíduos expostos à malária foram acompanhados durante 180 dias a fim de caracterizar a longevidade dos anticorpos frente aos antígenos PvAMA1V5 e PvAMA1V16. Ademais, foram selecionados por análises *in silico* utilizando a tecnologia da vacinologia reversa, quatro potenciais candidatos vacinais pouco estudados. Durante a infecção, os indivíduos tiveram resposta de anticorpos IgM contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16, porém essa resposta foi temporária, visto que não foi observada 50 e 180 dias após infecção. No que diz respeito a resposta de anticorpos IgG, na fase aguda da infecção os indivíduos apresentaram anticorpos antígeno-específicos em graus variados tanto contra as variantes de PvAMA1 quanto contra as quatro proteínas selecionadas pelas análises *in silico* e as respostas persistiram ao longo do tempo na ausência de reinfeção. A caracterização dos subtipos de células B mostrou que houve alterações nas populações de células B naives, células B de memória atípicas, imaturas e plasmócitos após infecção por malária vivax.

Palavras-chave: Malária; *Plasmodium vivax*; antígenos; imunidade humoral; memória imunológica.

ABSTRACT

Malaria is one of the most important public health problems worldwide. In Brazil, the main etiological agent is the protozoan of the species *Plasmodium vivax*. Vivax malaria is rarely lethal, but it has a major impact on the quality of life of populations in endemic areas. In addition, disease control and treatment measures are not fully effective, thus the search for alternative control methods, such as an effective vaccine, is a current and urgent need. Individuals naturally exposed to *Plasmodium vivax* infection develop varying degrees of immunity. Understanding naturally acquired immunity and immunological memory are essential for the development of a vaccine. Thus, this study aimed to characterize memory B cells and evaluate the naturally acquired humoral immune response against potential vaccine antigens in individuals exposed to vivax malaria/ living in endemic regions of Brazil. The first chapter of this work elucidates aspects of the genetic diversity of one of the main malaria vivax vaccine candidates, the PvAMA1 antigen. It was observed in *P. vivax* isolates from a Brazilian endemic region 19 PvAMA1 haplotypes. Two of these haplotypes were selected and expressed as recombinant proteins PvAMA1V5 and PvAMA1V16 were expressed. The naturally acquired IgG antibody response against them was quantified in individuals from two different endemic regions. Antibodies against both proteins were observed both in individuals with acute malaria and in individuals with a history of vivax malaria, which shows that there is longevity in the humoral immune response against these antigens. The second chapter focuses on the more in-depth characterization of the naturally acquired IgG and IgM antibody response over time and the memory B cell profile. For this, individuals exposed to malaria were followed for 180 days to characterize the longevity of the antibodies against the PvAMA1V5 and PvAMA1V16 antigens. Furthermore, four potential vaccine candidates that have not been studied were selected by in silico analysis using reverse vaccinology technology. During infection, subjects had a strong IgM antibody response against PvAMA1V5 and PvAMA1V16, but this response was transient as it was not observed 50 and 180 days after infection. Regarding the IgG antibody response, in the acute phase of the infection, individuals presented specific antigen antibodies in varying degrees both against the PvAMA1 variants and against the four proteins selected by in silico analysis and the responses persisted over time in the absence of reinfection. The characterization of the B cell subtypes showed that there were changes in the populations of naive B cells, immature B cells, atypical memory B cells and plasma cells after malaria vivax infection.

Keywords: Malaria; *Plasmodium vivax*; antigens; humoral immune response; immunological memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Países com casos autóctones de malária em 2021.....	19
Figura 2. Mapa do risco de malária por municípios brasileiros em 2021.....	21
Figura 3. Ciclo de vida do <i>Plasmodium vivax</i>	27
Figura 4. Expansão das células B de memória durante a infecção por <i>Plasmodium vivax</i>	33
Figura 5. Estratégia de <i>gates</i> para a caracterização fenotípica das células B por citometria de fluxo.	79
Figura 6. Sequência de análises utilizadas na seleção dos candidatos vacinais. .	83
Figura 7. Frequência dos sintomas clínicos após infecção por <i>P. vivax</i>	90
Figura 8. Parâmetros hematológicos durante e após infecção por <i>Plasmodium vivax</i>	92
Figura 9. Subtipos de células B de indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira durante fase aguda (D0) e convalescência (D50).	94
Figura 10. Subtipos de células B de indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira durante fase aguda e convalescência sem recorrência de malária durante os segmentos.	95
Figura 11. Subtipos de células B de indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira durante fase aguda e convalescência com recorrência de malária após D50.....	96
Figura 12. Comparação entre os subtipos de células B no D180 de indivíduos sem e com recorrência de malária e controle não endêmico.....	97
Figura 13. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 na fase aguda e convalescença.	99
Figura 14. Índices de reatividade de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra as proteínas PvAMA1V5 e PvAMA1V16 em D180 em indivíduos com e sem reexposição à malária.....	100
Figura 15. Comparação entre as respostas de anticorpos IgG naturalmente adquiridas contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 na fase aguda e convalescença.. ..	101

Figura 16. Frequências de células B totais e de memória nos indivíduos respondedores (IgG) contra proteína PvAMA1V5 durante a infecção por malária vivax (D0).....	102
Figura 17. Frequências de células B totais e de memória nos indivíduos respondedores (IgG) contra a proteína PvAMA1V5 após infecção por malária vivax (D50).....	103
Figura 18. Frequências de células B totais e de memória nos indivíduos respondedores e não respondedores (IgG) contra proteína PvAMA1V16 durante a infecção por malária vivax (D0).....	104
Figura 19. Frequências de células B totais e de memória nos indivíduos respondedores e não respondedores contra proteína PvAMA1V16 após infecção por malária vivax (D50).....	105
Figura 20. Resposta de anticorpos IgM naturalmente adquirida contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 na fase aguda e convalescença.	106
Figura 21. Comparação entre as respostas de anticorpos IgM naturalmente adquiridas contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 durante a infecção por <i>P. vivax</i>	107
Figura 22. Frequências de células B totais e células B de memória nos indivíduos respondedores e não respondedores (IgM) contra proteína PvAMA1V5 durante infecção por malária vivax (D0).....	108
Figura 23. Frequências de células B totais e células B de memória nos indivíduos respondedores e não respondedores (IgM) contra proteína PvAMA1V5 após infecção por malária vivax (D50).....	109
Figura 24. Frequências de células B totais e células B de memória nos indivíduos respondedores (IgM) contra proteína PvAMA1V16 durante infecção por malária vivax (D0).	110
Figura 25. Frequências de células B totais e células B de memória nos indivíduos respondedores (IgM) contra proteína PvAMA1V16 após infecção por malária vivax (D50).....	111
Figura 26. Transfecção de células HEK-293T.	113
Figura 27. Transfecção de células CHO-745.....	113

Figura 28. Transfecção de células HeLa.	114
Figura 29. Reatividade inespecífica entre células e plasmas de indivíduos imunes e não imunes.	115
Figura 30. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra o antígeno PVX_089 de <i>Plasmodium vivax</i>.	116
Figura 31. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra o antígeno PVX_119 de <i>Plasmodium vivax</i>.	117
Figura 32. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra o antígeno PVX_009 de <i>Plasmodium vivax</i>.	118
Figura 33. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra o antígeno PVX_111 de <i>Plasmodium vivax</i>.	119
Figura 34. Comparação entre os índices de reatividade de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra as proteínas PVX_089, PVX_119, PVX_009 e PVX_111 de <i>P. vivax</i> nos dias D0, D50 e D180.	120
Figura 35. Mapa do vetor de expressão pEGFP.	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vacinas contra a malária vivax em teste de fase clínica.	35
Tabela 2. Classificação dos subtipos de células B de acordo com o padrão de marcadores de superfície e fluorocromos específicos de cada anti-CD.	78
Tabela 3. Características da população de estudo em cada segmento.	89
Tabela 4. Características das proteínas selecionadas por análises <i>in silico</i>	112
Tabela 5. Anotações das sequências gênicas de <i>P. vivax</i> (Sal-1) utilizadas como critério de exclusão durante a etapa de pré-seleção <i>in silico</i>	156

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácidos
AMA1	<i>Apical Membrane Antigen 1</i> (Antígeno 1 de Membrana Apical)
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> (células apresentadoras de antígeno)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (grupamento de diferenciação)
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (Células de ovário de hamster)
CNE	Controle negativo endêmico
CNNE	Controle negativo não endêmico
CO ₂	Gás carbônico
CSP	<i>Circumsporozoite surface protein</i> (proteína de superfície circunsporozoíta)
CV	Coefficiente de variação
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i> (Padrões moleculares associados ao dano)
DARC	<i>Duffy antigen receptor for chemokines</i>
DBP	<i>Duffy Binding Protein</i> (proteína de ligação ao Duffy)
dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
D0	DIA 0
D50	DIA 50
D180	DIA 180
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)

GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína fluorescente verde)
G6PD	Glicose 6- fosfafo
Hb	Hemoglobina
HCT	Hematócrito
HEK-293	<i>Human embryonic kidney-293 cells</i> (células de rim embrionário humano)
HeLa	Henrietta Lacks
IFN γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleucina 1 β (IL-1 β)
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IR	Índice de Reatividade
LB	<i>Luria-Bertani</i>
mAbs	<i>Monoclonal antibodies</i> (Anticorpos monoclonais)
MBC	<i>Memory B cells</i> (Células B de memória)
MM	Matrix-M
MSP1	<i>Merozoite Surface Protein 1</i>
NCT	<i>National Clinical Trial</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear kappa B)
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
pb	Pares de bases
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)

PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline-Tween 20</i>
PLT	<i>Platelets (Plaquetas)</i>
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. brasianum</i>	<i>Plasmodium brasianum</i>
<i>P. cynomolgi</i>	<i>Plasmodium cynomolgi</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
RBC	<i>Red blood cells (eritrócitos)</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Tfh	Células <i>T helper</i> foliculares
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Fator de necrose tumoral α)
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WBC	<i>White blood cells</i> (leucócitos)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1 A situação da malária no Brasil e no mundo	19
1.2 Características gerais da malária	21
1.3 As especificidades da malária vivax	23
1.4 Ciclo de vida dos plasmódios	25
1.5 A resposta imune na malária	28
1.5.1 Memória na imunidade humoral.....	31
1.6 Desenvolvimento de vacinas contra a malária	34
2 JUSTIFICATIVA.....	41
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
CAPÍTULO 1 <i>Plasmodium vivax</i> AMA1: Implications of distinct haplotypes for immune response.....	44
CAPÍTULO 2 Avaliação da longevidade da resposta de anticorpos na malária causada por <i>Plasmodium vivax</i>	72
1. INTRODUÇÃO.....	73
4 MATERIAL E MÉTODOS	74
4.1 Coleta de amostras de pacientes com malária vivax.....	74
4.1.1 Área e população de estudo	74
4.2 Diagnóstico da infecção por <i>Plasmodium vivax</i> e tratamento.....	75
4.3 Processamento das amostras	76
4.4 Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)	77

4.5	Caracterização fenotípica das células B por citometria de fluxo.....	77
4.6	Resposta imune humoral contra as variantes PvAMA1V5 e PvAMA1V16 durante a fase aguda (D0) e convalescença (D50 e D180).....	80
4.7	Seleção de potenciais antígenos vacinais de <i>P. vivax</i> através de análises <i>in silico</i>	81
4.8	Expressão das proteínas recombinantes em sistema heterólogo eucarioto.....	83
4.8.1	Cultivo e transfecção das células CHO-745, HeLa e HEK-293T	85
4.9	Análise de reações inespecíficas entre as células e os plasmas	86
4.10	Detecção de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra os antígenos de <i>P. vivax</i>	86
4.11	Análises estatísticas.....	87
5	RESULTADOS	88
5.1	Caracterização da População do Estudo.....	88
5.1.1	Características demográficas da população de estudo	88
5.1.2	Parâmetros hematológicos	90
5.1.3	Fenotipagem dos Linfócitos B.....	92
5.2	Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra os antígenos PvAMA1V5 e PvAMA1V16.....	98
5.3	Resposta de anticorpos IgM naturalmente adquirida contra os antígenos PvAMA1V5 e PvAMA1V16.....	105
5.4	Antígenos selecionados por análises <i>in silico</i>	111
5.5	Expressão das proteínas recombinantes.....	112
5.6	Análise de reações inespecíficas entre as células e os plasmas imunes e não imunes.....	114
5.7	Ensaio de imunorreatividade para detecção de anticorpos IgG contra os antígenos de <i>P. vivax</i>	115

6 DISCUSSÃO.....	121
7 CONCLUSÃO	132
8 REFERÊNCIAS	133
ANEXOS	156
Anexo I: Tabela 5. Anotações das sequências gênicas de <i>P. vivax</i> (Sal-1) utilizadas como critério de exclusão durante a etapa de pré-seleção in silico.	156
Anexo II: Mapa do vetor de expressão pEGFP.	156
Anexo III: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	157
Anexo IV: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	162
Anexo V: Ficha Individual de Acompanhamento	165
Anexo VI: Declaração de Direitos Autorais	168
Anexo VII: Produção científica	169

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A situação da malária no Brasil e no mundo

A malária é uma doença muito antiga, que permanece até os dias atuais como um dos maiores problemas de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (COX, 2010; MS, 2020a). Mais de 200 milhões de casos de malária são reportados por ano globalmente, em 2021 foram registrados 247 milhões de casos e 619 mil mortes no mundo, sendo a maior parte de crianças menores de 5 anos (WHO, 2022; WHO, 2021).

As populações de países em desenvolvimento e situadas em regiões tropicais e subtropicais do globo são as mais afetadas, principalmente devido à falta de investimento em políticas públicas de controle da doença e às condições ambientais que favorecem o desenvolvimento dos mosquitos vetores e do agente causador da doença (SNOW; GUERRA; NOOR; MYINT *et al.*, 2005) (Figura 1).

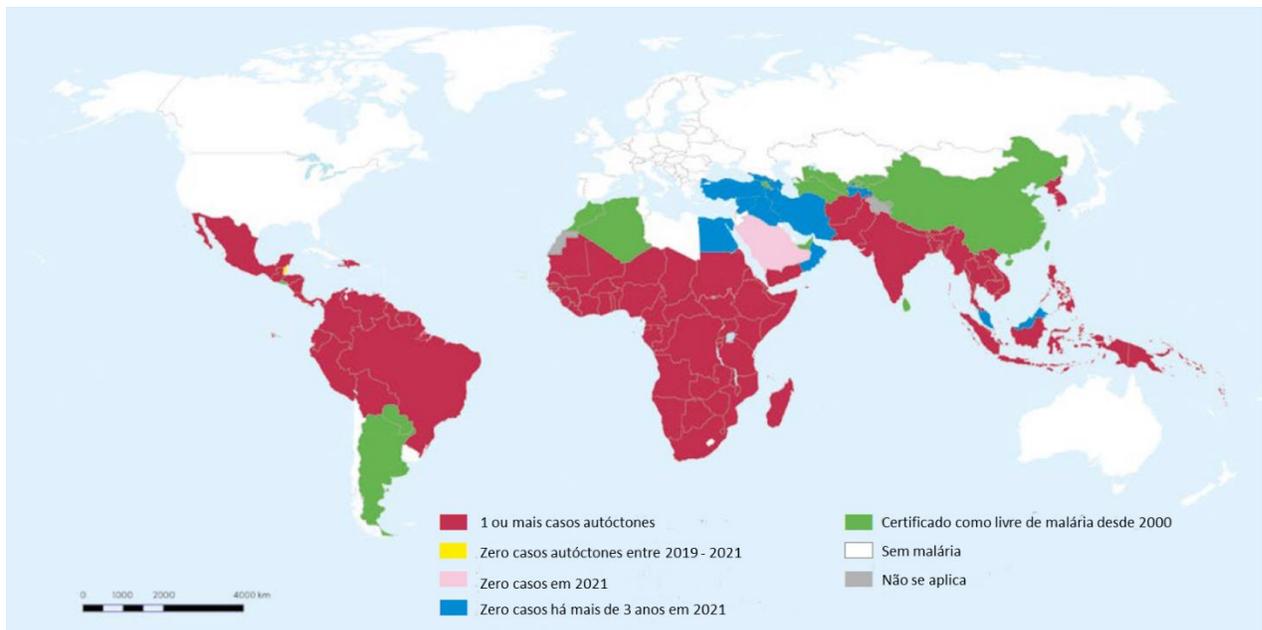


Figura 1. Países com casos autóctones de malária em 2021. Fonte: WHO, 2022.

A malária é causada por protozoários parasitos do gênero *Plasmodium*. *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) é a espécie responsável pela maioria dos casos de malária grave e também pelo maior número de mortes no mundo. Em áreas endêmicas estáveis, como na África, a maior parte das mortes ocorre em crianças menores de 5 anos (COWMAN; HEALER; MARAPANA; MARSH, 2016). *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) é responsável pela maioria dos casos fora da África Subsaariana (HOWES; BATTLE; MENDIS; SMITH *et al.*, 2016; WHO, 2020).

Na região das Américas ocorreram aproximadamente 600 mil casos e 334 mortes em 2021 (WHO, 2022). Nesta região, a malária representa um grave problema de saúde pública. As atividades econômicas relacionadas à floresta, à expansão agrícola, à mineração e ao trabalho na construção de estradas e usinas hidrelétricas resultam no aumento do desmatamento e levam a mudanças no comportamento das espécies que ali vivem, incluindo os mosquitos vetores da malária, o que gera o aumento da transmissão da malária nessas áreas (MS, 2020a).

No Brasil, a malária é mais comum na região amazônica, onde ocorrem 99% dos casos autóctones de malária, tendo municípios classificados como região de alto risco de transmissão (Figura 2) (MS, 2020a; MS, 2022). De acordo com dados do Ministério da Saúde, em 2021 foram reportados 139.097 casos de malária no país, predominantemente causados por *P. vivax* (115.329 casos) e 21.616 casos de malária *falciparum* (MS, 2022). A frequência de casos de malária na região amazônica urbana é de 9,9%, enquanto as regiões rural e indígena são responsáveis por 52,2% e 26,7% dos casos respectivamente, seguido das regiões de garimpo e assentamentos onde ocorrem 6,5% e 4,8% dos casos, respectivamente (MS, 2020a). Na região extra-amazônica, onde a malária não apresenta caráter endêmico, a maioria dos casos notificados são importados de outros estados ou países (MS, 2020b).

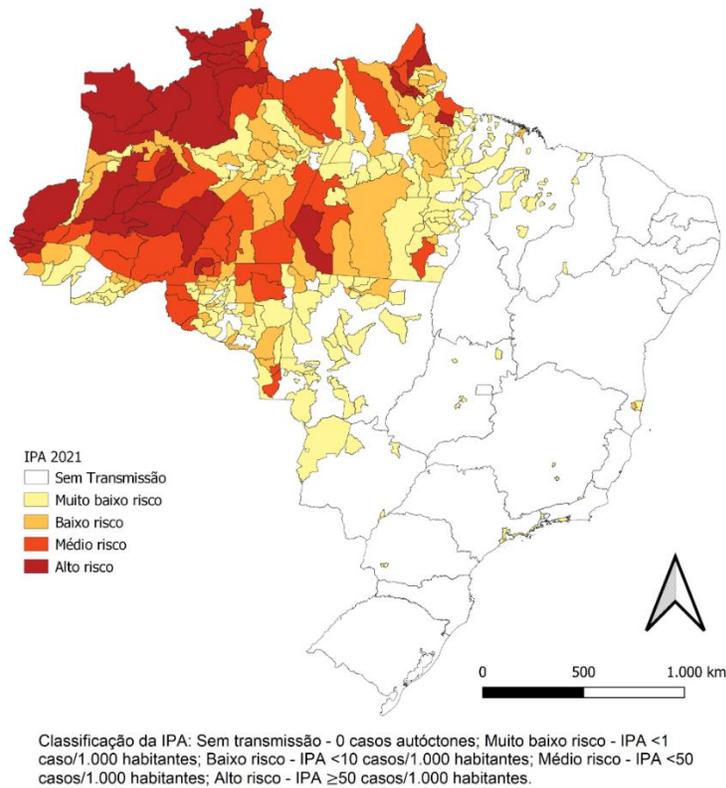


Figura 2. Mapa do risco de malária por municípios brasileiros em 2021. IPA: Incidência Parasitária Anual. Data de atualização dos dados: 05 de julho de 2022. Fonte: Sivep-Malária, Sinan/SVS/MS e Sinan, 2022.

1.2 Características gerais da malária

Os estudos científicos mais aprofundados sobre a malária tornaram-se possíveis após a descoberta do agente causador da doença. Em 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, observou pela primeira vez que existiam protozoários de diferentes formas presentes no sangue de pacientes com malária. Por essa grande descoberta, Laveran foi premiado com o Prêmio Nobel de medicina em 1907 (revisto por (COX, 2010)). Anos após a descoberta de Laveran, no ano de 1897 o estágio sexual do parasito presente no sangue de aves, foi visualizado pela primeira vez por William MacCallum. Em 1898, os malariologistas italianos Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi e Ettore Marchiafava descobriram que a malária

humana também era transmitida por mosquitos, especificamente mosquitos do gênero *Anopheles*. A descoberta do desenvolvimento dos parasitos no fígado foi feita por Henry Shortt and Cyril Garnham em 1948 e a presença de formas dormentes que se alojam no fígado foi descrita apenas 34 anos mais tarde por Wojciech Krotoski (revisto por (COX, 2010).

Atualmente sabe-se que a malária é uma doença causada por protozoários parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium* e que existem mais de 150 espécies de *Plasmodium* que infectam mamíferos, répteis e aves (P.C.C., 1966). As seguintes espécies são parasitos naturais de humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* (subespécies: *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*) e *Plasmodium malariae*, sendo as duas primeiras as mais prevalentes. Além destas, existem outras quatro espécies capazes de infectar humanos, apesar de estarem geralmente associadas à infecção de primatas não humanos, são elas: *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium brasilianum* e, a mais recentemente descrita, *Plasmodium simium* (BRASIL; ZALIS; DE PINA-COSTA; SIQUEIRA *et al.*, 2017; COX-SINGH; DAVIS; LEE; SHAMSUL *et al.*, 2008; LALREMRUATA; MAGRIS; VIVAS-MARTÍNEZ; KOEHLER *et al.*, 2015; SINGH; KIM SUNG; MATUSOP; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2004; TA; HISAM; LANZA; JIRAM *et al.*, 2014).

Os vetores da malária são mosquitos fêmea do gênero *Anopheles* spp. infectados por *Plasmodium* spp. Existem mais de 400 espécies de *Anopheles* descritas, das quais 30 são os principais vetores da malária (SINKA; BANGS; MANGUIN; CHAREONVIRIYAPHAP *et al.*, 2011; WHO, 2015). No Brasil, o principal vetor é o *Anopheles darlingi* (TADEI; THATCHER; SANTOS; SCARPASSA *et al.*, 1998). Esta espécie possui atividade hematofágica crepuscular e noturna, com maior atividade nas primeiras horas da noite (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; GUIMARÃES; ARLÉ; DA SILVA *et al.*, 1989; MS, 2020a) e seus criadouros são coleções de águas claras, quentes, sombreadas e pouco movimentadas (MS, 2020b).

Os sintomas da malária ocorrem durante o estágio eritrocítico do ciclo de vida do parasito (MILNER, 2018). Os principais sintomas são: cefaleia, febre, calafrio, fadiga,

desconforto abdominal, dores musculares e nas articulações e náuseas. Ademais, a doença pode evoluir para a forma grave, caracterizada pela presença de uma ou mais das seguintes manifestações clínicas: anemia grave, hipoglicemia, trombocitopenia, lesão renal aguda, icterícia com hiperparasitemia, edema pulmonar, acidose metabólica, malária cerebral (coma causado por *P. falciparum*), choque e sangramento grave (COWMAN; HEALER; MARAPANA; MARSH, 2016; WHO, W. H. O., 2015).

1.3 As especificidades da malária vivax

Entre as espécies que causam malária, *P. vivax* é a segunda mais prevalente no mundo (HOWES; BATTLE; MENDIS; SMITH *et al.*, 2016). No entanto, na África Ocidental a infecção por *P. vivax* ocorre raramente, isso porque a população desta região não possui em suas hemácias o antígeno do grupo *Duffy* (conhecido como DARC - *Duffy antigen receptor for chemokines*). A invasão do *P. vivax* ao eritrócito é restrita a reticulócitos que expressam CD71 (*Transferrin receptor 1*) e requer interação com PvDBP (*P. vivax Duffy-binding protein*) com o receptor DARC (DRAPER; SACK; KING; NIELSEN *et al.*, 2018; MALLERET; LI; ZHANG; TAN *et al.*, 2015). Desta forma, a ausência do antígeno *Duffy* confere proteção a estes indivíduos, apesar de já existirem relatos que mostram casos de transmissão ativa de *P. vivax* em indivíduos *Duffy* negativos, o que sugere que existe uma via alternativa de invasão (CAVASINI; MATTOS; COUTO; BONINI-DOMINGOS *et al.*, 2007; MENDES; DIAS; FIGUEIREDO; MORA *et al.*, 2011; RYAN; STOUTE; AMON; DUNTON *et al.*, 2006).

Durante muito tempo acreditou-se que *P. vivax* era um parasito incapaz de causar doença grave e morte. No entanto, esta teoria não é mais sustentada uma vez que existem relatos de casos de complicações graves em infecções causadas por *P. vivax* (AASHISH; MANIGANDAN, 2015; ALEXANDRE; FERREIRA; SIQUEIRA; MAGALHÃES *et al.*, 2010; COSTA; LOPES; ALBRECHT; ATAIDE *et al.*, 2012; GENTON; D'ACREMONT; RARE; BAEA *et al.*, 2008; RAHIMI; THAKKINSTIAN; WHITE; SIRIVICHAYAKUL *et al.*, 2014; TJITRA; ANSTEY; SUGIARTO; WARIKAR *et al.*, 2008), sendo parte desses casos graves associados a alguma comorbidade como infecções

virais (CRUZ; MORAES; QUEIROGA-BARROS; FUKUTANI *et al.*, 2019; MAGALHÃES; SIQUEIRA; ALEXANDRE; SOUZA *et al.*, 2014). Além disso, a malária vivax gera grandes impactos à saúde pública e à economia de regiões endêmicas, exercendo uma grande influência limitante na qualidade de vida e no desenvolvimento econômico (OBALDIA, 2015).

A biologia do *P. vivax* possui diversas particularidades. A parasitemia em infecções por *P. vivax* é baixa (raramente excede 2-3% das hemácias) uma vez que o parasito invade preferencialmente reticulócitos. Em comparação, na malária falciparum a parasitemia é mais alta, podendo exceder 20-30%, uma vez que *P. falciparum* não possui essa mesma especificidade (DAYANANDA; ACHUR; GOWDA, 2018). A forma sexual do *P. vivax* (gametócito) tem forma circular enquanto o gametócito de *P. falciparum* possui formato mais alongado, semelhante ao formato de uma banana. Além disso, grânulos no citoplasma dos reticulócitos (conhecidos como granulações de Schüffner) são encontrados apenas em infecções por *P. vivax* facilitando a diferenciação desta espécie em análise por microscopia óptica (UDAGAMA; ATKINSON; PEIRIS; DAVID *et al.*, 1988).

Os maiores desafios no controle da malária vivax estão relacionados a alguns outros aspectos específicos do parasito, como a capacidade de gerar formas dormentes durante o estágio hepático (hipnozoítos) (WHITE; IMWONG, 2012), o alto potencial de transmissão devido à presença de gametócitos antes do início dos sintomas e o ciclo de vida mais curto no vetor, em relação ao ciclo de vida do *P. falciparum* (MUELLER; GALINSKI; BAIRD; CARLTON *et al.*, 2009). Além disso, as análises experimentais com *P. vivax* são muito difíceis devido à falta de um sistema de cultivo *in vitro* de longa duração (MUELLER; GALINSKI; BAIRD; CARLTON *et al.*, 2009). Todas essas singularidades da malária vivax evidenciam a importância do estudo e da implementação de estratégias específicas de combate a esta espécie.

O tratamento da malária vivax visa combater tanto as formas sanguíneas quanto hepáticas. Para isso, prescreve-se o uso de dois medicamentos combinados: Cloroquina e Primaquina. Caso o paciente volte a ter malária do dia 5 ao 60 após início do tratamento, o recomendado é um outro esquema composto pelo uso de artemeter e lumefantrina ou artesunato, mefloquina e primaquina (MS, 2020b). A Primaquina é uma

8-aminoquinoleína, utilizada contra as formas dormentes do parasito. Recentemente, foi aprovado o uso de outra 8-aminoquinoleína que atua contra as formas dormentes, a Tafenoquina, também associada ao uso da cloroquina, porém administrada em dose única (MS, 2020b; MS, 2021).

Apesar de existirem medicações disponíveis, ressaltam-se alguns problemas relacionados ao seu uso, como a resistência do parasito à cloroquina (BAIRD, 2004; RIJKEN; BOEL; RUSSELL; IMWONG *et al.*, 2011; TEKA; PETROS; YAMUAH; TESFAYE *et al.*, 2008). Além disso, o uso incorreto das 8-aminoquinoleínas causa recaída em 70% dos casos (LACERDA; LLANOS-CUENTAS; KRUDSOOD; LON *et al.*, 2019) e mesmo com o uso correto existe a chance de recaída devido a problemas na metabolização do medicamento, sendo necessário o aumento da dose. Ainda, associado ao uso dessas medicações, existe o risco de hemólise grave em pessoas com deficiência na enzima Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), situação que é frequente em áreas endêmicas para malária (BAIRD; MAGUIRE; PRICE, 2012; LACERDA; FRAGOSO; ALECRIM; ALEXANDRE *et al.*, 2012).

Por fim, ainda no que diz respeito ao controle e prevenção da doença, até o momento não existe uma vacina contra a malária vivax, embora alguns candidatos vacinais estejam sendo estudados, poucos estudos estão em fase clínica (DA VEIGA; MORIGGI; VETTORAZZI; MÜLLER-SANTOS *et al.*, 2022; DUFFY; PATRICK GORRES, 2020). Todas estas particularidades relacionadas à malária vivax, somadas à deficiência nas medidas de controle do vetor, reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas e estratégias de prevenção e combate à doença.

1.4 Ciclo de vida dos plasmódios

Os plasmódios possuem um ciclo de vida complexo que é alternado entre estágios de reprodução assexuada (esquizogônica) em células parenquimatosas no fígado (esquizogonia hepática), seguido da multiplicação nos eritrócitos (esquizogonia eritrocitária) no hospedeiro vertebrado e um estágio sexual (esporogônica) no hospedeiro invertebrado (*Anopheles* spp.).

Durante o repasto sanguíneo, o mosquito fêmea infectado inocula os parasitos (esporozoítos) na derme do hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos se movem até a corrente sanguínea e migram até o fígado, onde invadem os hepatócitos e inicia-se o estágio pré-eritrocítico. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos desenvolvem-se em uma forma latente, denominada hipnozoíta, que podem permanecer dormentes no fígado por semanas a anos (KROTOSKI, 1985). Após este período de inatividade podem reativar-se causando o que se chama de recaída da doença (KROTOSKI, 1985). Os parasitos que não evoluem para a forma latente multiplicam-se e dão origem a esquizontes, que se rompem liberando na corrente sanguínea milhares de novos parasitos (merozoítos), dando início ao estágio eritrocítico.

Neste estágio, merozoítos de *P. vivax* invadem os reticulócitos (SIMPSON; SILAMUT; CHOTIVANICH; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1999), enquanto os de *P. falciparum* invadem eritrócitos no geral a partir de um processo complexo envolvendo diversos ligantes e receptores dos parasitos e eritrócitos. No interior dos eritrócitos desenvolvem-se em trofozoítos jovens, conhecidos como forma de anel devido a sua morfologia, seguido de trofozoítos maduros que darão origem a esquizontes após divisões nucleares sequenciais sem citocinese. Cada esquizonte contém cerca de 20 merozoítos que são liberados na corrente sanguínea, após o rompimento do eritrócito, e invadem novos eritrócitos iniciando um novo ciclo (TUTEJA, 2007). Alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuadas, chamadas gametócitos, que não sofrem mais divisões.

Durante um repasto sanguíneo, os mosquitos ingerem o sangue de um indivíduo infectado contendo gametócitos. Com isso, inicia-se o ciclo sexuado dentro do trato digestivo do *Anopheles* spp. No intestino médio, os gametócitos fêmea e macho diferenciam-se em macrogameta e microgameta, respectivamente, e em seguida ocorre a fecundação que resulta na formação de um zigoto (ocineto). O oocineto penetra na parede das células do intestino médio e transforma-se em oocisto que por esporogonia forma esporozoítos. O oocisto se rompe e libera esporozoítos na hemolinfa do *Anopheles* spp. e estes migram até as suas glândulas salivares. Desta forma, quando o mosquito picar um hospedeiro vertebrado inicia-se um novo ciclo (Figura 3).

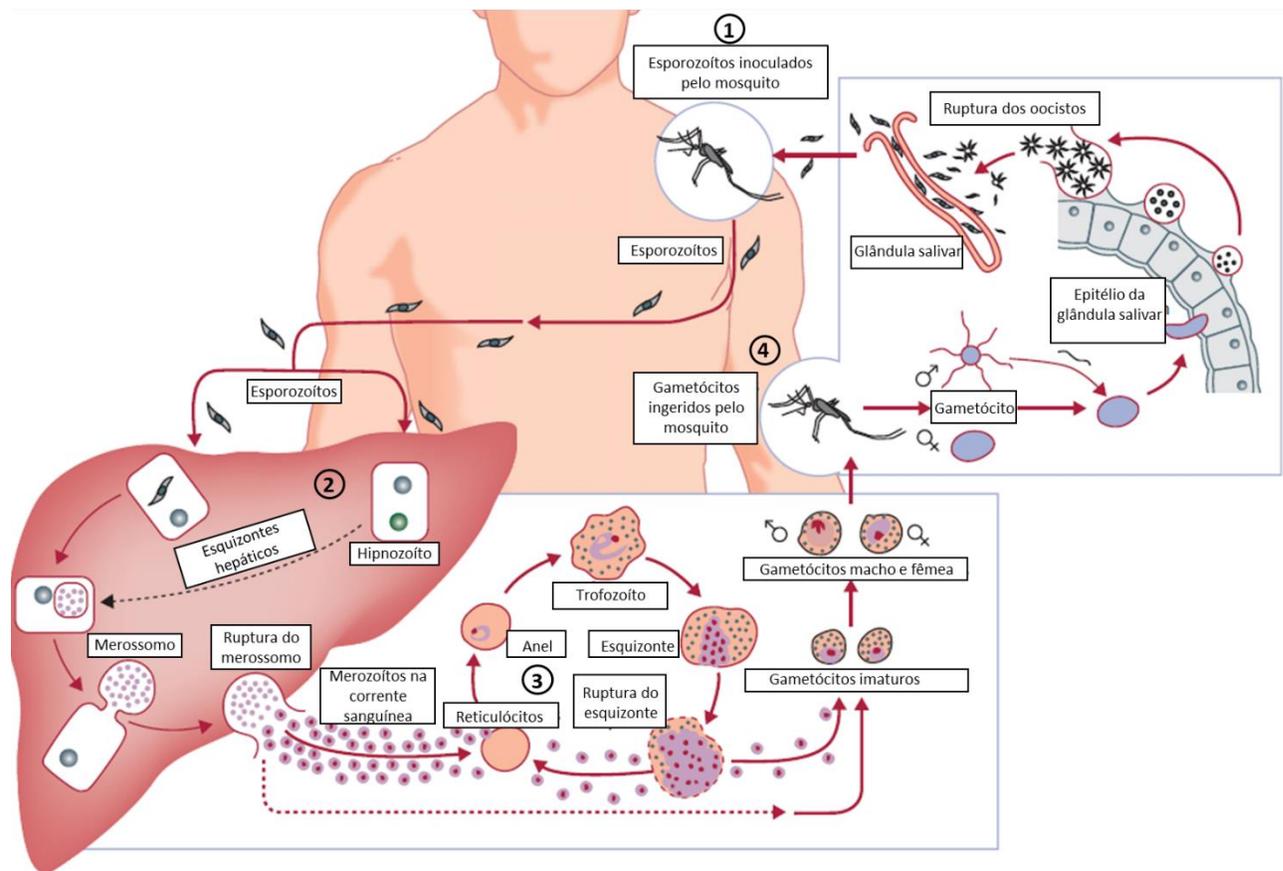


Figura 3. Ciclo de vida do *Plasmodium vivax*. (1) O mosquito inocula formas esporozoítas do parasito no hospedeiro vertebrado que migram até o fígado, invadindo hepatócitos. (2) No fígado, o parasito pode se diferenciar em hipnozoítas (formas dormentes) ou em esquizontes hepáticos. Os parasitos ativos sofrem divisões mitóticas e liberam merozoítas na corrente sanguínea, iniciando o ciclo eritrocítico. (3) Em infecções por *P. vivax*, ocorre a invasão dos reticulócitos. Após a invasão, os parasitos se desenvolvem (trofozoítas jovens, maduros e esquizontes) e os eritrócitos se rompem liberando novos merozoítas que reiniciam outro ciclo eritrocítico ou se diferenciam em gametócitos. (4) Gametócitos circulantes são ingeridos por mosquitos *Anopheles* spp. durante o repasto sanguíneo, iniciando o ciclo sexual no qual ocorre a fertilização dos gametócitos macho e fêmea e a formação de um zigoto seguido de liberação de oocistos que se diferenciam em novos esporozoítas nas glândulas salivares. Fonte: Adaptado de Mueller et al., Lancet Infect Dis 2009; 9: 555–66.

1.5 A resposta imune na malária

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa e ocorre independentemente de qualquer contato prévio com o parasito. As células do sistema imune inato, por exemplo as células dendríticas, podem ser ativadas por vários componentes derivados do parasito, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e pelos padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Acredita-se que os PAMPs sejam conservados entre as espécies de *Plasmodium* e sabe-se que alguns dos PAMPs de *P. falciparum* são: a hemozoína, o DNA do parasito e as âncoras de glicosilfosfatidilinositol de proteínas do parasito (ANTONELLI; JUNQUEIRA; VINETZ; GOLENBOCK *et al.*, 2020). Os DAMPs são componentes endógenos liberados por células hospedeiras estressadas, em apoptose ou mortas. Alguns exemplos são: ácido úrico, microvesículas e o heme (FIGUEIREDO; FERNANDEZ; MOURAO-SA; PORTO *et al.*, 2007; MANTEL; MARTI, 2014).

Uma resposta imune inata forte acontece durante a fase aguda da infecção e é marcada por uma resposta pró-inflamatória mediada principalmente pelo interferon γ (IFN- γ), ativação do fator nuclear kappa B (NF κ B) e pela indução de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (ANTONELLI; JUNQUEIRA; VINETZ; GOLENBOCK *et al.*, 2020). A resposta imune pró-inflamatória rápida e robusta é importante para o controle da infecção, pois atua enquanto ainda não há resposta adaptativa. Entretanto, a ativação de células imunes inatas resulta na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) que causam os sintomas da malária (STEVENSON; RILEY, 2004).

A resposta imune adaptativa é constituída pelas respostas celular e humoral e tem como alvos os antígenos dos diferentes estágios do parasito. A resposta imune adaptativa é mais intensa durante o estágio eritrocítico, quando comparado ao estágio pré-eritrocítico, e os principais agentes imunológicos nestes dois estágios são os anticorpos e as células T CD8⁺, respectivamente (HAFALLA; COCKBURN; ZAVALA, 2006; HISAEDA; YASUTOMO; HIMENO, 2005).

Após a picada do mosquito *Anopheles* spp., as células dendríticas da pele e os linfonodos de drenagem da pele apresentam antígenos para as células T CD8⁺, que por sua vez, produzem citocinas que ajudam a controlar parasitemia (revisto por (ANTONELLI; JUNQUEIRA; VINETZ; GOLENBOCK *et al.*, 2020). Além disso, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos ativados levam à produção de citocinas e a morte de hepatócitos infectados mediada por grânulos contendo granzimas e perforinas (TRAPANI; SMYTH, 2002). Na malária vivax, a resposta de células T ainda não foi bem elucidada. No entanto, um estudo recente mostrou que células T CD8⁺ de pacientes com malária vivax expressam proteínas citotóxicas e reconhecem e formam sinapses com os reticulócitos infectados, sendo capazes de eliminar reticulócitos e parasitos, prevenindo a reinvasão (JUNQUEIRA; BARBOSA; COSTA; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2018). Enquanto as células T CD4⁺ atuam como coestimuladores de células B de memória e plasmócitos, sendo necessárias na indução e manutenção de anticorpos (BEESON; OSIER; ENGWERDA, 2008) e produção de IFN- γ que ativam macrófagos e promovem *clearance* dos eritrócitos infectados (HISAEDA; YASUTOMO; HIMENO, 2005).

O sistema imunológico atua em todas as fases do ciclo de vida do parasito, porém, a resposta imune naturalmente adquirida é gerada, principalmente, contra antígenos expressos no estágio eritrocítico, que é responsável pelas manifestações clínicas da doença. Esta resposta controla a parasitemia, oferece proteção contra o agravamento dos sintomas e diminui a mortalidade (MARSH; KINYANJUI, 2006; MUELLER; GALINSKI; TSUBOI; AREVALO-HERRERA *et al.*, 2013).

A primeira evidência da importância dos anticorpos no controle da infecção pela malária foi obtida através de estudos nos quais imunoglobulinas G (IgG) de indivíduos imunes contra a malária foram transferidas passivamente para indivíduos não imunes e tiveram a capacidade de reduzir a parasitemia e controlar os sintomas da doença (COHEN; BUTCHER; CRANDALL, 1969; COHEN; MCGREGOR; CARRINGTON, 1961; SABCHAREON; BURNOUF; OUATTARA; ATTANATH *et al.*, 1991). Atualmente sabe-se que moradores de regiões endêmicas desenvolvem a imunidade naturalmente adquirida à malária, geralmente mediada por anticorpos, após exposições repetidas ao parasito (MUELLER; GALINSKI; TSUBOI; AREVALO-

HERRERA *et al.*, 2013). No entanto, muito precisa ser esclarecido sobre o papel dos anticorpos na proteção contra a malária.

A imunidade humoral na malária consiste predominantemente na resposta de anticorpos IgG, principalmente as subclasses IgG1 e IgG3 que possuem receptores Fc de alta afinidade que podem interagir com o complemento e células imunes. Mais recentemente foi visto que anticorpos IgM específicos também atuam na proteção contra manifestações clínicas de *P. falciparum*. A proteção contra a malária clínica foi associada a IgG e IgM específicos para alvos pré-eritrocíticos e de estágio sanguíneo de *P. falciparum* (O'FLAHERTY; ROE; FOWKES, 2022).

Os alvos de anticorpos são mais bem caracterizados em merozoítos e eritrócitos infectados (TEO; FENG; BROWN; BEESON *et al.*, 2016), apesar de existirem evidências do seu papel nos outros estágios, como atuando no bloqueio da invasão dos esporozoítos nos hepatócitos (HOLLINGDALE; NARDIN; THARAVANIJ; SCHWARTZ *et al.*, 1984; RATHORE; NAGARKATTI; JANI; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2005; SEGUIN; BALLOU; NACY, 1989; VANDERBERG; FREVERT, 2004).

No estágio eritrocítico, os anticorpos possuem diversas funções. Estudos mostraram que antígenos de merozoítos são alvos dos anticorpos e que existe uma relação entre a presença de anticorpos IgG contra potenciais candidatos vacinais e a proteção contra a malária sintomática (BEESON; DREW; BOYLE; FENG *et al.*, 2016; FOWKES; RICHARDS; SIMPSON; BEESON, 2010; RICHARDS; ARUMUGAM; REILING; HEALER *et al.*, 2013), sendo IgG1 e IgG3 as subclasses de IgG relacionadas com a proteção (NOGUEIRA; ALVES; FERNANDEZ-BECERRA; PEIN *et al.*, 2006; ROUSSILHON; OEUVRAY; MÜLLER-GRAF; TALL *et al.*, 2007; STANISIC; RICHARDS; MCCALLUM; MICHON *et al.*, 2009; TRAN; OLIVEIRA-FERREIRA; MORENO; SANTOS *et al.*, 2005). A atuação dos anticorpos quando reconhecem estes alvos nos merozoítos pode ser tanto direta (através da ligação aos receptores Fc nos fagócitos) quanto indireta (fixação do complemento) através da remoção pelos fagócitos. Além disso, a ingestão dos merozoítos por fagócitos leva à liberação de mediadores inflamatórios que impedem o crescimento de outros parasitos.

Estudos *in vivo* mostraram que anticorpos específicos contra antígenos envolvidos no processo de invasão, são capazes de bloquear a entrada do parasito no eritrócito (AKTER; KHOURY; AOGO; LANSINK *et al.*, 2019; REILING; RICHARDS; FOWKES; WILSON *et al.*, 2012; TRAN; ONGOIBA; COURSEN; CROSNIER *et al.*, 2014) e também impedir a replicação do parasito (GONZALES; REYES; BRADDOM; BATUGEDARA *et al.*, 2020). Além disso, foi visto que em infecções por *P. falciparum* os anticorpos possuem a função de impedir a citoaderência de eritrócitos infectados às células endoteliais (BEESON; OSIER; ENGWERDA, 2008; WIPASA; ELLIOTT; XU; GOOD, 2002) e que anticorpos contra o domínio DBL- α de PfEMP-1 foram capazes de inibir a formação de rosetas e promoverem fagocitose e opsonização das rosetas (GHUMRA; KHUNRAE; ATAIDE; RAZA *et al.*, 2011).

1.5.1 Memória na imunidade humoral

A imunidade adaptativa tem como característica a habilidade de responder de forma rápida e robusta à reexposição a um antígeno, devido a sua capacidade de gerar memória imunológica. Este fenômeno é uma propriedade fundamental do sistema imune adaptativo e é a base para o desenvolvimento de formulações vacinais. Para a maioria das vacinas, os anticorpos neutralizantes executam um papel crucial na resposta imune protetora, portanto, os mecanismos envolvidos na geração e manutenção da resposta imune de memória é de grande interesse (revisto por (CROMPTON; MIRCETIC; WEISS; BAUGHMAN *et al.*, 2009).

Em regiões onde a malária é endêmica, indivíduos são expostos naturalmente à infecção malárica repetidamente. Estas exposições subsequentes geram uma resposta imune contra diversas cepas com intensidade variável de acordo com a taxa de transmissão da região (GREENWOOD, 1987). Em indivíduos hiperimunes, ocorre a diminuição da parasitemia e dos sintomas (imunidade clínica) (GAZZINELLI; KALANTARI; FITZGERALD; GOLENBOCK, 2014). No entanto, a resposta imune gerada é espécie-específica e cepa-específica (MARSH; HOWARD, 1986; MARSH; KINYANJUI, 2006; MUELLER; GALINSKI; TSUBOI; AREVALO-HERRERA *et al.*, 2013) e, geralmente,

não é o suficiente para prevenir uma nova infecção (TRAN; LI; DOUMBO; DOUMTABE *et al.*, 2013). O mecanismo pelo qual isto ocorre, não é bem elucidado, mas existem evidências que mostram que anticorpos citofílicos e células de memória produzidos após infecções repetidas são responsáveis por esta proteção (BAIRD; JONES; DANUDIRGO; ANNIS *et al.*, 1991).

A produção de imunoglobulinas contra os plasmódios é dependente de células T. Vários receptores de superfície e moléculas solúveis medeiam a interação entre células T foliculares (Tfh) e células B (ANTONELLI; JUNQUEIRA; VINETZ; GOLENBOCK *et al.*, 2020). A geração de resposta de imune humoral T-dependente em órgãos linfoides secundários geralmente começa após o encontro das células B naive com o antígeno, o que desencadeia sua migração para a borda do folículo das células B onde encontram as células T auxiliares (Figura 4).

As células B ativadas se diferenciam em uma das três rotas possíveis, levando à produção de plasmócitos de vida curta, formação de centros germinativos em folículos de células B e células B de memória (MBC). Os centros germinativos se estabelecem alguns dias após o encontro inicial com o antígeno e maturação por afinidade formando dois compartimentos distintos: a região escura, onde os clones de células B sofrem expansão proliferativa e hipermutação somática de seus genes de imunoglobulina, e a região clara, onde as células B que expressam anticorpos de alta afinidade são selecionados e passam por recombinação de troca de classe. A reação dos centros germinativos leva à geração de MBC e plasmócitos de vida longa que contribuem para a proteção do hospedeiro contra a reinfecção. Os plasmócitos migram para a medula óssea e fornecem uma fonte contínua de anticorpos circulantes de alta afinidade, enquanto as MBC recirculam no sangue e o tecido linfóide secundário para induzir uma resposta efetora rápida quando houver reexposição ao antígeno (revisto por (LY; HANSEN, 2019).

As células B de memória são geradas durante a infecção ou após vacinação e são essenciais para a obtenção de uma imunidade humoral duradoura. Elas podem ser classificadas com base na expressão de CD27 e CD21 (MOIR; HO; MALASPINA; WANG *et al.*, 2008), que torna possível a diferenciação entre as células B naives (CD19⁺CD27⁻CD21⁺), MBC clássicas (CD19⁺CD27⁺CD21⁺) e MBC atípicas (CD19⁺CD27⁻CD21⁻). Além

disso, com anti-CD10 diferencia-se células B imaturas ($CD19^+CD10^-$) e através do anti-CD20 são classificados os plasmócitos ($CD19^+,CD10^-,CD21^-,CD27^+,CD20^-$) e células B ativadas ($CD19^+,CD10^-,CD21^-,CD27^+,CD20^+$) (HVIID; BARFOD; FOWKES, 2015; SIMS; ETTINGER; SHIROTA; YARBORO *et al.*, 2005) (Figura 4).

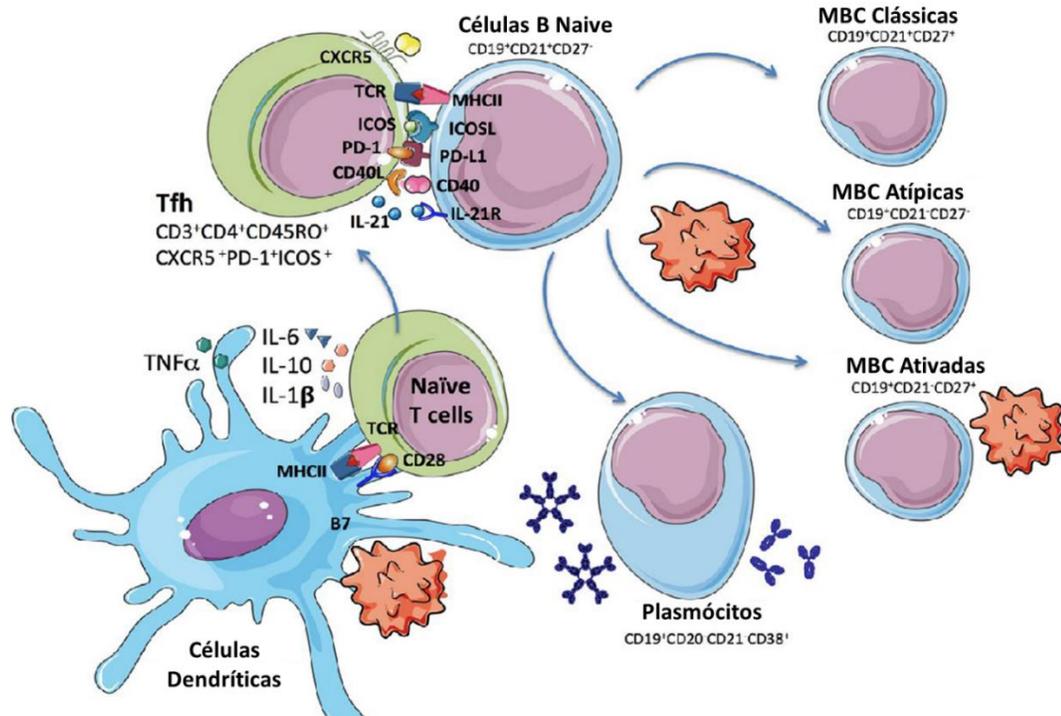


Figura 4. Expansão das células B de memória durante a infecção por *Plasmodium vivax*. A diferenciação das células T foliculares (Tfh) é estimulada pela interação entre células T CD4+ e células dendríticas. A interação entre as células Tfh e as células B naive ocorre no centro germinativo (GC) o que promove a diferenciação das células B em células de memória ou plasmócitos, que são células secretoras de anticorpos de alta afinidade. Fonte: Adaptado de: (ANTONELLI; JUNQUEIRA; VINETZ; GOLENBOCK *et al.*, 2020).

A imunidade naturalmente adquirida protetora contra a malária se desenvolve lentamente, após infecções sucessivas, sendo os antígenos de estágio sanguíneo os principais alvos (revisto por (HVIID; BARFOD; FOWKES, 2015). Alguns estudos relataram que respostas de anticorpos específicos contra antígenos de fase sanguínea são transitórias (AKPOGHENETA; DUAH; TETTEH; DUNYO *et al.*, 2008; KINYANJUI;

BULL; NEWBOLD; MARSH, 2003; KINYANJUI; CONWAY; LANAR; MARSH, 2007; OFORI; DODOO; STAALSOE; KURTZHALS *et al.*, 2002), enquanto outros relatam que a resposta pode persistir por longos períodos mesmo na ausência de reexposição (LIMA; FERNANDES; TORRES; PIRES *et al.*, 2022; WIPASA; ELLIOTT; XU; GOOD, 2002). Além disso, estudos relataram níveis significativos de anticorpos na ausência de memória de células B (DORFMAN; BEJON; NDUNGU; LANGHORNE *et al.*, 2005) enquanto outros mostram resposta de células B de memória duradoura na ausência de anticorpos circulantes (AMPOMAH; STEVENSON; OFORI; BARFOD *et al.*, 2014; NDUNGU; LUNDBLOM; RONO; ILLINGWORTH *et al.*, 2013). Devido a tantos relatos contraditórios na literatura e aos poucos estudos que avaliam a indução e manutenção de células B de memória contra *P. vivax* em humanos, torna-se ainda mais importante compreender a base da memória humoral em indivíduos expostos à malária vivax.

1.6 Desenvolvimento de vacinas contra a malária

Há mais de 30 anos a pesquisa visando a uma vacina contra a malária é intensa e ao mesmo tempo um dos maiores desafios para a comunidade científica. Isso deve-se, principalmente, às características biológicas do parasito, à complexidade do seu ciclo de vida, à expressão de diferentes antígenos estágio-específicos (ESCALANTE; LAL; AYALA, 1998; TAKALA; PLOWE, 2009) e à grande diversidade genética nas populações de *Plasmodium* que lhes permite escapar da resposta imune. Desta forma, as respostas induzidas pela vacina precisam ser protetoras e contra diferentes estágios a fim de produzirem uma ampla proteção (OUATTARA; BARRY; DUTTA; REMARQUE *et al.*, 2015). Um desafio adicional é a incapacidade de manter espécies de *Plasmodium* spp., que infectam humanos, em cultura, com exceção do *P. falciparum* (HAYNES; DIGGS; HINES; DESJARDINS, 1976).

O desenvolvimento de vacinas contra a malária falciparum tem sido intenso e promissor e atualmente diversos candidatos vacinais estão em fase pré-clínica ou clínica de teste. No entanto, as pesquisas visando uma vacina para a malária vivax são muito restritas, dentre outros fatores, devido a falta de um sistema de cultivo *in vitro* de longa

duração, à preferência dos parasitos invadirem reticulócitos, o que limita a possibilidade de estudos *ex vivo* e a ausência de um modelo animal específico para estudar essa espécie. Assim, os estudos ficam limitados a ensaios funcionais utilizando parasitas provenientes de isolados de campo e, na maioria das vezes, a escolha dos alvos em potencial é baseada nos resultados encontrados para vacinas contra a malária *falciparum*. Essa realidade pode ser facilmente visualizada ao observarmos os poucos candidatos vacinais contra a malária *vivax* que encontram-se em fase pré-clínica ou clínica (Tabela 1).

Tabela 1. Vacinas contra a malária *vivax* em teste de fase clínica.

Candidato	Fase	Principais resultados	Número NCT*
VMP001	1/2a	rPvCSP com adjuvante AS01B. Redução da parasitemia, porém com baixa eficácia protetora.	NCT01157897
Peptides N R&C	1b/2	PvCSP derivado de <i>Long Synthetic Peptides</i> (LSP) com adjuvante Montanide ISA 720 e 51. Resposta de anticorpos de longa duração, com eficácia de 36,6% em voluntários naive.	NCT0108184
PvRAS	1/2a	Esporozoíto irradiado de <i>P. vivax</i> . Baixa resposta celular e 42% de eficácia protetora.	NCT01082341
ChAd63-MVA-PvDBPII	1a/2a	Sistema de imunização <i>prime-boost</i> heterólogo com vetor viral ChAd63-MVA-PvDBPII. Indução de anticorpos que inibiram interação com reticulócitos, resposta humoral e celular, 50% e resposta a outras cepas.	NCT01816113
PvDBPII-GLA-SE	1	rPvDBPII com adjuvante GLA-SE. Alta produção de anticorpos específicos que inibiram interação com reticulócitos e resposta a outras cepas.	CTRI/2016/09/007289
Pvs25	1	rPvs25 com adjuvante Montanide ISA 51. Boa indução de anticorpos e 30% de redução de parasitos em mosquitos infectados. Alta reatogenicidade.	NCT00295581

* NCT (número do *National Clinical Trial*): é uma identificação atribuída a um estudo quando o protocolo é enviado pela parte responsável e aprovado pela equipe do ClinicalTrials.gov.

Fonte: Adaptado de (DA VEIGA; MORIGGI; VETTORAZZI; MÜLLER-SANTOS *et al.*, 2022).

As formulações vacinais são geralmente classificadas em grupos de acordo com o estágio do ciclo de vida do parasito: vacinas de estágio pré-eritrocítico, eritrocítico ou de estágio sexual (bloqueio de transmissão). Além das vacinas contra um antígeno estágio-específicos, existe um crescente aumento nas pesquisas de vacinas

multiestágios, que podem incluir antígenos expressos durante diferentes estágios. A vantagem de uma vacina de múltiplos estágios, em oposição a múltiplos antígenos para um único estágio, é que ao cobrir vários estágios do ciclo de vida do parasito aumenta a probabilidade de proteção se os parasitos progredirem de um estágio para o seguinte (WILSON; FLANAGAN; PRAKASH; PLEBANSKI, 2019).

Vacinas de estágio pré-eritrocítico: têm como alvo antígenos de esporozoítos ou parasitos de estágio hepático. Possuem o objetivo de induzir anticorpos contra antígenos de superfície, a fim de eliminar esporozoítos, bloquear a invasão dos hepatócitos, ou induzir respostas de células T que atacam hepatócitos infectados. As vacinas de estágio pré-eritrocítico reduzem infecções, previnem o estabelecimento de hipnozoítos e impedem o desenvolvimento da doença, uma vez que bloqueiam o desenvolvimento do estágio eritrocítico (DUFFY; PATRICK GORRES, 2020).

A única vacina aprovada para uso em humanos, até o momento, é a vacina de estágio pré-eritrocítico, para a malária falciparum, chamada RTS,S. Essa formulação contém parte da proteína circunsporozoíta (CSP), o maior antígeno de superfície de esporozoítos, contemplando a repetição central e regiões C terminal fusionados ao antígeno de superfície da hepatite B ("S"). No ensaio clínico de fase III em crianças e bebês utilizando a vacina RTS,S com o adjuvante AS01, foi obtida a eficácia de 36% em crianças durante 48 meses após vacinação e 55,8% de eficácia em crianças de 5 a 17 meses durante o primeiro ano (AGNANDJI; LELL; FERNANDES; ABOSSOLO *et al.*, 2012; RTS, 2014; 2015). A vacina RTS,S / AS01E (Mosquirix™) recebeu um parecer favorável da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2015 após a revisão de sua segurança e eficácia para reduzir os episódios clínicos de malária por *P. falciparum* em crianças africanas. Outros ensaios clínicos seguem em andamento e novas estratégias para aumentar a imunogenicidade da vacina estão sendo estudadas.

Recentemente foram publicados resultados muito promissores de uma nova vacina chamada R21/Matrix-M. A sua formulação é semelhante à da RTS, S, baseada na proteína CSP. No entanto, possui antígeno da hepatite B em menor quantidade comparado à RTS, S. O esquema vacinal foi dividido em 3 grupos, com os grupos 1 e 2 diferindo na dose de adjuvante Matrix-M (MM) e o grupo 3 foi o controle. Foram vacinadas

crianças de 5 a 17 meses, com três doses da vacina em um intervalo de 4 semanas e uma quarta dose 1 ano depois. A formulação mostrou-se segura e a eficácia da vacinação foi de 74% no grupo 1 e 77% no grupo 2 após seis meses. Após 1 ano, a eficácia da vacina permaneceu alta, com 77% de proteção no grupo 1 (DATOO; NATAMA; SOMÉ; TRAORÉ *et al.*, 2021).

Apesar dos resultados obtidos para as vacinas RTS, S e R21/Matrix-M, as vacinas baseadas na proteína circunsporozoíta de *P. vivax* não tiveram resultados satisfatórios e poucas formulações chegaram a fase clínica. Um dos estudos mais promissores até o momento foi com a VMP001/AS01B no qual a vacina se mostrou segura e induziu fortes respostas imunes humoral e celular, porém, não foi capaz de conferir imunidade esterelizante (BENNETT; YADAVA; TOSH; SATTABONGKOT *et al.*, 2016). Além desse, o estudo de fase II com PvCS/ISA-51 apresentou uma capacidade protetora de 54,5% em voluntários não imunes (naives), sendo que destes, 36% apresentaram imunidade esterelizante, enquanto no grupo de indivíduos semi-imunes, evidenciou-se eficácia ainda maior ($\geq 60\%$) (ARÉVALO-HERRERA; GAITÁN; LARMAT-DELGADO; CAICEDO *et al.*, 2022). Atualmente outro estudo clínico de fase II com esse antígeno vacinal encontra-se ativo (NCT04739917).

Além dos estudos com a proteína PvCSP, os antígenos vacinais de fase pré-eritrocítica mais promissores são a PvTRAP e PvCelTOS. A PvTRAP em ensaios pré-clínicos mostrou que é capaz de induzir resposta de anticorpos e de células T e proteção parcial (BAUZA; MALINAUSKAS; PFANDER; ANAR *et al.*, 2014; CASTELLANOS; ARÉVALO-HERRERA; RESTREPO; GULLOSO *et al.*, 2007), enquanto em estudos com a vacinas baseadas em PvCelTOS, foi visto em ensaios pré-clínicos a capacidade de indução resposta imune humoral e celular e proteção esterilizante (ALVES; SALMAN; LEORATTI; LOPEZ-CAMACHO *et al.*, 2017) (BERGMANN-LEITNER; LEGLER; SAVRANSKAYA; OCKENHOUSE *et al.*, 2011; BERGMANN-LEITNER; MEASE; DE LA VEGA; SAVRANSKAYA *et al.*, 2010).

Vacinas de estágio eritrocítico: têm como alvo os parasitos na forma de merozoítos, que invadem os eritrócitos e realizam ciclos subsequentes de reprodução assexuada. Vacinas de estágio eritrocítico têm como objetivo controlar a multiplicação do

parasito ou eliminar a infecção neste estágio. Desta forma, essas formulações têm a capacidade de controlar a morbidade e mortalidade. No entanto, existem alguns desafios para o desenvolvimento de vacinas anti-merozoíta, como por exemplo o breve período que os merozoítos estão expostos aos anticorpos, o alto polimorfismo antigênico e o grande número de parasitos nesse estágio (DUFFY; PATRICK GORRES, 2020).

Dentre os candidatos de estágio eritrocítico, o antígeno *Plasmodium vivax* *Duffy Binding Protein* (PvDBP) é atualmente o mais promissor, sendo o único que avançou para testes clínicos. Anticorpos anti-PvDBP são capazes de bloquear a invasão do parasito aos eritrócitos, uma vez que a interação entre PvDBP e o receptor DARC contido nos eritrócitos é uma das interações necessárias no processo de invasão (CHITNIS, 2001; GAUR; MAYER; MILLER, 2004). Estudos comprovaram que a presença de anticorpos naturalmente adquiridos contra PvDBP estão relacionados com a proteção contra a malária vivax (HE; SHAKRI; BHARDWAJ; FRANÇA *et al.*, 2019; NICOLETE; FRISCHMANN; BARBOSA; KING *et al.*, 2016). Duas formulações contendo o antígeno PvDBP completaram a fase I dos ensaios clínicos e induziram altos títulos de anticorpos anti-PvDBP (PAYNE; SILK; ELIAS; MILNE *et al.*, 2017; SINGH; MUKHERJEE; SHAKRI; SINGH *et al.*, 2018).

Outros dois candidatos muito estudados são o *Merozoite Surface Protein-1* (MSP-1) e *Apical Membrane Antigen-1* (AMA1). Altos níveis de anticorpos anti-PvMSP1 são observados em indivíduos recentemente expostos à malária vivax, por isto este antígeno é considerado um marcador de infecção (WANG; ZHAO; ZHANG; LI *et al.*, 2016). A PvMSP1 é uma proteína transmembrana envolvida no contato inicial entre o parasito e o eritrócito (CHENG; WANG; ITO; KONG *et al.*, 2013; HAN; CHO; CHENG; MUH *et al.*, 2018). Testes de imunogenicidade e experimentos de proteção foram realizados em primatas não-humanos e obtiveram resultados positivos (DARKO; ANGOV; COLLINS; BERGMANN-LEITNER *et al.*, 2005; PERERA; HANDUNNETTI; HOLM; LONGACRE *et al.*, 1998). Além disso, camundongos imunizados com PvMSP119 quimérica, geraram uma forte resposta de anticorpos e resposta de células T CD4+ e CD8+ (DOBRESU; DE CAMARGO; GIMENEZ; MURILLO *et al.*, 2020; FONSECA; CABRERA-MORA; SINGH; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2016).

O antígeno PvAMA1 é expresso durante o estágio de merozoíta e é responsável pela formação da estrutura chamada *moving junction*, formada entre receptores e ligantes do parasito e eritrócito e utilizada no processo de invasão do parasito ao eritrócito (COWMAN; TONKIN; THAM; DURAISINGH, 2017; DUTTA; HAYNES; MOCH; BARBOSA *et al.*, 2003; TRIGLIA; HEALER; CARUANA; HODDER *et al.*, 2000). Diversos estudos evidenciam o potencial da proteína AMA1 como candidato vacinal desde resultados *in vitro* demonstrando a inibição da invasão dos merozoítos às hemácias gerada por anticorpos anti-AMA1 (TRIGLIA; HEALER; CARUANA; HODDER *et al.*, 2000), assim como inibição da invasão dos esporozoítos aos hepatócitos (SILVIE; FRANETICH; CHARRIN; MUELLER *et al.*, 2004). Ainda, estudos demonstraram a capacidade de indução de resposta imune em humanos naturalmente expostos à malária (BITTENCOURT; SILVA; VIRGILI; SCHAPPO *et al.*, 2020; POLLEY; MWANGI; KOCKEN; THOMAS *et al.*, 2004; SETH; BHAT; RAO; BISWAS, 2010). Por fim, em estudos de fase pré-clínica em primatas não-humanos vacinados com uma formulação contendo AMA1 de *P. knowlesi* observou-se resposta protetora de anticorpos específicos (CREWETHER; MATTHEW; FLEGG; ANDERS, 1996; DEANS; KNIGHT; JEAN; WATERS *et al.*, 1988; NARUM; OGUN; THOMAS; HOLDER, 2000).

Vacinas de estágio sexual: têm como alvo antígenos dos parasitos de estágio sexual (gametócitos e oocinetos), com o objetivo de induzir anticorpos contra parasitos após repasto sanguíneo e interromper o desenvolvimento do parasito no vetor e, conseqüentemente, a transmissão da doença. Vacinas de bloqueio de transmissão não fornecem nenhum benefício direto ao indivíduo, uma vez que o indivíduo adquire a doença, mas levam a uma redução da prevalência da infecção por malária (BEESON; KURTOVIC; DOBAÑO; OPI *et al.*, 2019; DUFFY; PATRICK GORRES, 2020). Além disso, uma vantagem desse tipo de vacina é que os candidatos vacinais tendem a possuir menor diversidade genética que os antígenos de estágio eritrocítico ou pré-eritrocítico (LÓPEZ; YEPES-PÉREZ; HINCAPIÉ-ESCOBAR; DÍAZ-ARÉVALO *et al.*, 2017), provavelmente devido a menor exposição ao sistema imune humano.

O principal antígeno vacinal de bloqueio de transmissão é o Pvs25, um antígeno de superfície de oocineto, ortólogo do antígeno Pfs25 de *P. falciparum*. Diversos

estudos utilizando diferentes sistemas de expressão de antígenos e modelos animais foram realizados (BLAGBOROUGH; MUSIYCHUK; BI; JONES *et al.*, 2016; BLAGBOROUGH; YOSHIDA; SATTABONGKOT; TSUBOI *et al.*, 2010; KONGKASURIYACHAI; BARTELS-ANDREWS; STOWERS; COLLINS *et al.*, 2004), mas poucas formulações progrediram para estudos clínicos. As mais promissoras até o momento foram Pvs25H recombinante expresso em *S. cerevisiae* formulado em Alhydrogel® que induziu uma resposta insuficiente de anticorpos, apesar de ter demonstrado atividade bloqueadora da transmissão (MALKIN; DURBIN; DIEMERT; SATTABONGKOT *et al.*, 2005) e Pvs25H em Montanid e ISA 51 que apesar de ter gerado uma resposta de anticorpos e 30% de redução nos mosquitos infectados, causou reatogenicidade. Dessa forma, ambos estudos não progrediram (WU; ELLIS; SHAFFER; FONTES *et al.*, 2008). Atualmente, encontra-se ativo o estudo em fase I da formulação Pvs25-IMX313/MatrixM (NCT05270265).

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de vacinas contra a malária tem sido um dos grandes desafios para a comunidade científica. A compreensão da imunidade contra a malária e a identificação de novos antígenos capazes de estimular a produção e a manutenção de anticorpos protetores de longa duração são pontos fundamentais a serem estudados visando uma vacina eficaz. Diversos estudos abordam a resposta imune humoral na malária, porém, os resultados são contraditórios no que diz respeito à capacidade de manutenção da resposta imune.

Estudos mostram que a reinfecção é necessária para manter a imunidade adquirida contra a malária e que os anticorpos antimaláricos têm vida curta na ausência de reinfecção, devido a uma resposta de células B de memória defeituosa ou baixa (WIPASA; SUPHAVILAI; OKELL; COOK *et al.*, 2010). Análises longitudinais com crianças mostraram que os títulos de anticorpos contra diversos antígenos de *Plasmodium falciparum* diminuem rapidamente após a doença (AKPOGHENETA; DUAH; TETTEH; DUNYO *et al.*, 2008; CAVANAGH; ELHASSAN; ROPER; ROBINSON *et al.*, 1998; KINYANJUI; CONWAY; LANAR; MARSH, 2007). Por outro lado, outras evidências mostram que a resposta de anticorpos aumenta com a idade do indivíduo (AKPOGHENETA; DUAH; TETTEH; DUNYO *et al.*, 2008; NOGARO; HAFALLA; WALTHER; REMARQUE *et al.*, 2011; WIPASA; SUPHAVILAI; OKELL; COOK *et al.*, 2010) e que as respostas de anticorpos permanecem estáveis na ausência de reinfecção (SOARES; CUNHA; FERRAZ-NOGUEIRA; MARINS-DOS-SANTOS *et al.*, 2019; UDHAYAKUMAR; KARIUKI; KOLCZACK; GIRMA *et al.*, 2001; WIPASA; SUPHAVILAI; OKELL; COOK *et al.*, 2010).

Atualmente existem poucas formulações vacinais em estágio avançado de desenvolvimento contra a malária vivax. Um dos principais antígenos estudados é a proteína PvAMA1, envolvida no processo de invasão do parasita ao eritrócito e que possui capacidade antigênica bem descrita. Apesar do potencial associado a este antígeno, a diversidade genética intrínseca ao gene *pvama1* é um dos limitantes na geração de resposta imune antígeno-específico abrangente e efetiva. Portanto, a

caracterização da diversidade genética e avaliação da capacidade antigênica de variantes de *pvama1* são essenciais na busca por respostas sobre o seu potencial vacinal.

Apesar de existirem alguns candidatos vacinais com potencial para uma nova formulação contra a malária vivax, como o antígeno PvAMA1, poucos estão em fase pré-clínica ou clínica de desenvolvimento. Um dos motivos para esse número limitado de antígenos vacinais é a falta de uma metodologia de cultivo *in vitro* de longa duração, que facilite o estudo do parasita e a descoberta de novos alvos. Assim, as análises *in silico* tornam-se grandes aliadas na seleção de potenciais antígenos vacinais.

Diante da divergência de dados e muitas incertezas a respeito na imunidade na malária, evidencia-se a importância da caracterização da resposta imune antígeno-específica bem como o estudo de novos alvos. Assim, os resultados obtidos com este projeto poderão contribuir para um melhor entendimento da resposta imune naturalmente adquirida, bem como do potencial antigênico e a longevidade de anticorpos antígeno específicos contra os potenciais candidatos vacinais estudados, abrindo novas perspectivas no desenvolvimento de vacinas no combate à malária vivax.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade genética do antígeno PvAMA1 e a resposta imune humoral, gerada por antígenos de *Plasmodium vivax*, em indivíduos de regiões endêmicas brasileiras distintas e avaliar a longevidade da resposta imune na fase de convalescença.

3.2 Objetivos específicos

- (I) Caracterizar a diversidade genética do gene *pvama1* e descrever os haplótipos encontrados em isolados de Manaus;
- (II) Detectar a presença de anticorpos naturalmente adquiridos contra duas variantes de PvAMA1, em indivíduos residentes em duas áreas endêmicas distintas da Amazônia brasileira;
- (III) Selecionar potenciais antígenos vacinais por análises *in silico*;
- (IV) Avaliar o perfil fenotípico de linfócitos de indivíduos com malária vivax e convalescentes;
- (V) Identificar a longevidade das respostas de anticorpos IgG contra os antígenos vacinais.

CAPÍTULO 1 *Plasmodium vivax* AMA1: Implications of distinct haplotypes for immune response

Najara Carneiro Bittencourt, Ana Beatriz lung Enembreck da Silva, Natália Silveira Virgili, Ana Paula Schappo, João Henrique D. B. Gervásio, Tamirys S. Pimenta, Mario A. Kujbida Junior, Ana Maria R. S. Ventura, Rosana M. F. Libonati, João Luiz Silva-Filho, Hellen Geremias dos Santos, Stefanie C. P. Lopes, Marcus V. G. Lacerda, Ricardo L. D. Machado, Fabio T. M. Costa, Letusa Albrecht

Artigo publicado na revista *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2020, 14(7).

RESEARCH ARTICLE

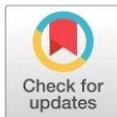
Plasmodium vivax AMA1: Implications of distinct haplotypes for immune response

Najara Carneiro Bittencourt¹ , Ana Beatriz lung Enembreck da Silva² , Natália Silveira Virgili¹, Ana Paula Schappo², João Henrique D. B. Gervásio² , Tamirys S. Pimenta³, Mario A. Kujbida Junior² , Ana Maria R. S. Ventura³, Rosana M. F. Libonati³, João Luiz Silva-Filho¹, Hellen Geremias dos Santos², Stefanie C. P. Lopes^{4,5}, Marcus V. G. Lacerda^{4,5}, Ricardo L. D. Machado⁶, Fabio T. M. Costa¹, Letusa Albrecht^{2*} 

1 Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil, **2** Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Curitiba, PR, Brazil, **3** Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil, **4** Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Gerência de Malária, Manaus, AM, Brazil, **5** Instituto Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ-AMAZONAS, Manaus, AM, Brazil, **6** Centro de Investigação de Microrganismos, Universidade Federal Fluminense, RJ, Brazil

 These authors contributed equally to this work.

* letusa.albrecht@fiocruz.br, letusaa@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Bittencourt NC, Silva ABEd, Virgili NS, Schappo AP, Gervásio JHDB, Pimenta TS, et al. (2020) *Plasmodium vivax* AMA1: Implications of distinct haplotypes for immune response. PLoS Negl Trop Dis 14(7): e0008471. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471>

Editor: Photini Sinnis, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, UNITED STATES

Received: August 29, 2019

Accepted: June 10, 2020

Published: July 8, 2020

Copyright: © 2020 Bittencourt et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: DNA sequences were deposited in GenBank with accession numbers MH049550 to MH049589. All other data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant 476904/2013-7 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant 2012/16525-2, and fellowship grants 2015/02808-0 (to NB), 2016/

Abstract

In Brazil, *Plasmodium vivax* infection accounts for around 80% of malaria cases. This infection has a substantial impact on the productivity of the local population as the course of the disease is usually prolonged and the development of acquired immunity in endemic areas takes several years. The recent emergence of drug-resistant strains has intensified research on alternative control methods such as vaccines. There is currently no effective available vaccine against malaria; however, numerous candidates have been studied in the past several years. One of the leading candidates is apical membrane antigen 1 (AMA1). This protein is involved in the invasion of Apicomplexa parasites into host cells, participating in the formation of a moving junction. Understanding how the genetic diversity of an antigen influences the immune response is highly important for vaccine development. In this study, we analyzed the diversity of AMA1 from Brazilian *P. vivax* isolates and 19 haplotypes of *P. vivax* were found. Among those sequences, 33 nonsynonymous PvAMA1 amino acid sites were identified, whereas 20 of these sites were determined to be located in predicted B-cell epitopes. Nonsynonymous mutations were evaluated for their influence on the immune recognition of these antigens. Two distinct haplotypes, 5 and 16, were expressed and evaluated for reactivity in individuals from northern Brazil. Both PvAMA1 variants were reactive. Moreover, the IgG antibody response to these two PvAMA1 variants was analyzed in an exposed but noninfected population from a *P. vivax* endemic area. Interestingly, over 40% of this population had antibodies recognizing both variants. These results have implications for the design of a vaccine based on a polymorphic antigen.

12855-9 (JLS-FCNPq) (306767/2018-8 (CNPq to RLDM). MVGL and FTMC are Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) research fellows. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Plasmodium vivax is the most abundant *Plasmodium* species in Brazil. While this species has been neglected for many years, the recent emergence of drug-resistant strains and the absence of a vaccine intensified the efforts for a better control method. Naturally acquired immune response analysis is a useful tool for understanding the antigenicity of *Plasmodium* proteins and evaluating the potential of a vaccine candidate. In this study, the genetic variability of one of the leading *P. vivax* vaccine candidates (PvAMA1) was analyzed. Two distinct variants were expressed and the antibody response was evaluated in infected and noninfected individuals in the Brazilian Amazon. This improved understanding of the magnitude and dynamics of the antibody response will contribute to the knowledge of a vaccine candidate and open new perspectives in vivax malaria vaccine development.

Introduction

Malaria remains one of the greatest global public health problems, with approximately 3.3 billion people being at risk of infection. In South and Central America, *P. vivax* accounts for over 70% of malaria cases, thereby representing the most prevalent *Plasmodium* species. In Brazil, approximately 174,000 cases of vivax malaria were reported last year, which corresponds to 89.2% of the total number of malaria cases [1, 2].

P. vivax infection can be treated with chemotherapy; however, resistance is rising and alternative therapies are increasingly desirable [3]. No vaccines against vivax malaria are available to date. Nevertheless, several vaccine candidates have been studied [4, 5]. Among these candidates, the leading antigen candidate for vivax malaria is apical membrane antigen 1 (AMA1).

AMA1 is expressed in the microneme of Apicomplexa parasites, present in all *Plasmodium* species. AMA1 is involved in the process of parasite invasion into host cells [6, 7], and, working together with proteins of the roptry neck protein (RON) complex, in the formation of the moving junction (MJ) [8]. Moreover, AMA1 is also involved in the invasion of sporozoites into human hepatocytes [9]. This antigen presents a unique opportunity as a multi-stage vaccine target. Attempts to silence *ama1* of *P. falciparum* and *Toxoplasma gondii* have shown that AMA1 has a central role in merozoite invasion, indicating that this protein might be essential to parasite survival [6, 10]. Studies with *P. berghei* sporozoites showed that without AMA1, parasites can invade and develop in hepatocytes, but subsequently formed merozoites cannot invade erythrocytes. These results suggested that AMA1 has a fundamental role in the blood stage cycle, which could be involved in the connection, redirection and stabilization of erythrocyte binding [11]. Taking into account the vital importance of AMA1 to the parasite, this protein has also been considered an important target for parasite control [12, 13].

The immunogenic potential of AMA1 was first observed after immunization of *Rhesus* monkeys with the native protein purified from *P. knowlesi*, which induced significant protection against infection [14]. Furthermore, immunization of mice or monkeys with recombinant protein derived from *P. chabaudi* or *P. fragile*, respectively, was able to induce significant protection [15, 16]. In addition, immune epidemiological studies conducted in Brazil showed that *P. vivax* AMA1 is highly immunogenic in natural infections [17].

AMA1 contains four regions: 1) pro-sequence, 2) rich cysteine ectodomain, 3) transmembrane domain and 4) cytoplasmic region. Within the ectodomain, the disulfide bridges formed by cysteine residues enable them to be separated into three domains (D), referred to as DI, DII, and DIII [18]. The highest rate of mutations and genetic diversity has been shown within

DI [19]. DII has a high degree of amino acid conservation and is the most immunogenic region of AMA1 in *P. falciparum* and *P. vivax* [20], being recognized for human antibodies after natural infection [17]. Although the genetic diversity of malaria antigens has been extensively studied, this subject is a matter of high importance, since the effectiveness of a vaccine or a drug might depend on the conservation of specific amino acid sites.

This study examined the impact of the genetic diversity of *P. vivax* AMA1 (PvAMA1) on the reactive profile of two distinct haplotypes in an endemic malaria region. The hypothesis is that genetic polymorphisms might direct the immune response.

Methods

Ethics statements

Ethical permission for the study was obtained by the local ethical committee in Manaus, AM, Brazil (CAAE-0044.0.114.000–11) and Itaituba, PA, (Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Pará (Protocol no. 1.088.855/2015) and of Instituto Evandro Chagas (Protocol no. 1.219.346/2015). All samples were collected after obtaining written consent from all individuals.

Sample collection

Blood samples for DNA extraction and sequence analysis were collected from patients with malaria who were seeking medical care at *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado*, Manaus, Amazonas state, a low transmission region located in northern Brazil from 2011 to 2012. Blood samples were collected using BD Vacutainer with sodium citrate anticoagulant. Blood analysis was carried out just after blood collection using a Sysmex KX21N (Sysmex Corporation-Roche, Japan).

A thin blood smear was prepared from each blood sample to determine species of malaria parasites. Any mixed *Plasmodium* spp. infections were detected and excluded from analysis after a PCR species-specific diagnostic was performed as previously described [21].

Plasma samples were collected in Manaus (2011–2012), Amazonas-Brazil (-03°06'26"S; 60°01'34"W) and in Itaituba, Pará, Brazil (04°16'34"S; 55°59'01"W), a gold mining area, located in the most southwestern part of the state of Pará. Plasma from Itaituba were collected during the year of 2016. Samples from Manaus were from non-severe patients currently infected with *P. vivax* (n = 33). *P. vivax* samples from Itaituba were from two distinct groups: 1) non-severe patients acutely infected with *P. vivax* (n = 79), 2) individuals who were previously, but not currently, infected with malaria (n = 92). After collection of peripheral blood, patients received treatment following national guidelines.

The annual parasite incidence designates Itaituba as an area with a high risk of malaria transmission (102.0 cases/1000 inhabitants per year). In contrast, Manaus presents low malaria transmission (5.8 cases/1000 inhabitants per year). In northern Brazil, the predominant species is *P. vivax*, although there are some registered cases of *P. falciparum* and *P. malariae* [22].

Genomic DNA extraction, amplification and sequencing of *pvama1*

Genomic DNA from malaria infected peripheral blood was extracted using the phenol:chloroform method [23]. Four overlapping fragments of PvAMA1 were amplified as previously described [24]. To minimize nucleotide mis-incorporation, all PCR reactions were performed using Platinum Taq High Fidelity (Thermo Fisher Scientific). Each PCR product was analyzed by electrophoresis in a 1.2% agarose gel. PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The purified PCR products were stored at

-20°C until sequencing was performed. PCR fragments were sequenced in forward and reverse directions using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 (PerkinElmer, MA, USA) at the automatic sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA) at the LACTAD platform at UNICAMP (Campinas, SP, Brazil).

Genetic analysis of *pvama1*

Sequences of *pvama1* from 40 isolates from Manaus were analyzed. Fragments of each sample were analyzed and assembled using the software *Phred* [25] and *pregap4*, present in the *Staden Package* [26]. Sequence data were deposited in GenBank (Accession numbers: GenBank MH049550 to MH049589). The coding gene sequence, measuring 1,689 bp in length, from *pvama1* (nt1–1,689 and aa1–562) was analyzed using MEGA 7.026 software. These sequences were aligned together with the reference sequence PvAMA1 from the *P. vivax* Sal-I strain (PVX_092275) to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) [27].

Each of the 40 sequences was parsed in the 3 functional domains of the protein, which were analyzed as its own individual set of data. The DNA polymorphism analysis tool (DnaSP 6.12.03) was used to calculate the number of polymorphisms, number of haplotypes, gene diversity and nucleotide diversity (π). Tajima's D test was performed to assess the selective pressure on the *pvama1* gene using the same software. The frequency of polymorphic sites in DI, DII and DIII was compared through Chi-square test. Public sequences from previous studies [20, 24, 28–35] were also compared to sequences from Manaus.

The values of synonymous substitution (dS) and nonsynonymous substitution (dN) were obtained by computing the overall mean distance of the sequences pairwise with the substitution type syn-nonsynonymous, using Nei-Gojobori [36] with Jukes and Cantor correction [37] as implemented in the MEGA 7.026 software. To obtain dS values, only synonymous substitutions were accounted for followed by calculating the mean in each sequence. The same method was used to obtain dN values, taking into consideration only nonsynonymous substitutions. Standard errors of dS and dN were estimated by bootstrap with 1000 replications. To determine whether natural selection contributes to diversity of PvAMA1, the ratio of nonsynonymous to synonymous substitutions (dN/dS) was evaluated for the entire protein as well as for DI, DII and DIII through Z-test using MEGA 7.026 software.

To obtain a dendrogram showing genetic proximity, the online program PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) was used. The Bayesian information criterion (BIC) was applied to select a final model with 1000 bootstrap resampling.

Predicted linear B-cell epitopes and position of mutations on the 3D protein structure

B-cell epitope predictions for PvAMA1 from the reference *P. vivax* genome Sal1 (PVX_092275) were conducted at BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor [38]. An epitope threshold of 0.5 with a length of at least 5 amino acids long was applied. B-cell epitopes and mutation sites inside predicted B cell epitopes were visualized as a three-dimensional structure of PvAMA1 (PDB ID: 1W81) using Pymol [39].

Recombinant PvAMA1 (rPvAMA1) expression and purification

Sequences corresponding to the PvAMA1 ectodomain (nucleotides 130 to 1490) from two PvAMA1 haplotypes (H5 and H16) were cloned into the pGEX 4T-1 vector and transformed into *E. coli* Arctic Express (DE3) competent cells (Agilent Technologies) for protein expression.

Bacteria were cultured according to the manufacturer's instructions. Briefly, 100 mL of overnight culture was transferred into 3000 mL of LB containing gentamicin (20 µg/mL) and ampicillin (100 µg/mL). The culture was placed at 37°C and grown until reaching an optical density (OD)₆₀₀ of 0.6. Cells were induced by the addition of 0.08 mM IPTG for 16 h at 12°C. The culture was collected by centrifugation (6,000 g, 10 min), and resuspended in 20 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) in the presence of 1X Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and incubated for 1 h on ice. The culture was then disrupted using an M-110L Pneumatic High Shear Fluid Processor (Microfluidics). Cell fragments were pelleted by 30 min of centrifugation at 10000 x g. The supernatant was collected and tested by SDS-PAGE and western blotting to confirm the recombinant protein expression. The synthesized recombinant proteins were purified using Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

Circular Dichroism Analysis

CD (Circular dichroism) spectroscopy was performed to predict the secondary structure of the two PvAMA1 variants. CD spectrum was recorded on a JASCO J-815 CD spectrometer. PvAMA1V5 and PvAMA1V16 proteins were buffer exchanged into 15mM Potassium phosphate pH 8.0. and concentrated to 0.16 mg/mL. Proteins were scanned from 260 to 190 nm using a 0.1 cm path length cuvette. Data were corrected for the baseline with respect to buffer and analyzed using Spectra manager version 2. The ellipticity (θ) values were calculated according to Kelly et al., 2005 [40].

Measurement of naturally acquired antibody to rPvAMA1 variants

Naturally acquired IgG antibodies against two rPvAMA1 variants were measured in plasma samples by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). First, plasma samples from infected patients from Manaus were evaluated. Subsequently, samples collected in gold-mining regions in Itaituba from infected and noninfected individuals who had previously been exposed to vivax malaria were analyzed to evaluate the persistence of antibodies against the PvAMA1 variants.

Briefly, high binding plates were coated with 50 µl of each rPvAMA1 variant (PvAMA1V5 and PvAMA1V16) at 5 µg/mL in coating buffer (0.05M carbonate-bicarbonate pH 9.6), overnight, at room temperature. Plasma samples diluted 1:100 were added to each well and incubated for 1 h at room temperature. Goat anti-human IgG conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich) was used for detection at a dilution of 1:2000. The presence of IgG antibodies was detected by O-phenylenediamine diluted in phosphate-citrate buffer containing 0.003% hydrogen peroxide. The OD was measured at 490 nm using CLARIOstar data analysis. All OD₄₉₀ values were normalized using the values of the anti-GST control. Plasma samples of 20 healthy individuals from a non-endemic area were used as negative controls. The cutoff value was calculated as the mean plus three standard deviations of the negative control. The reactivity indexes were obtained from the ratio of absorbance values of each sample and the cut off value. IgG reactive indexes greater than one were considered to be positive. Bias produced by a possible reactivity of the GST tag was evaluated as described by Bittencourt et al., 2018 [41].

Quantification of Plasmatic Cytokines

The plasma cytokines IL-6, IFN- γ , IL-10 and TNF- α were quantified by flow cytometry using IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α Human Flex Set (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The mean fluorescence intensity of each bead cluster was determined, and the forth logistic regression was applied to build the standard curve.

Table 1. Comparison of *pvama1* genetic diversity among isolates from Brazil.

Region	Residues	S	H	Gene diversity (sd)	π (Tajima D)	dN (s.e)	dS (s.e)	dN/dS	p-value
Entire gene	1–562	51	19	0.923(0.026)	0.0062(-0.4721)	0.0066 (0.0015)	0.0047 (0.0018)	1,40	0.27
DI	42–248	27	10	0.719(0.066)	0.0110 (0.2816)	0.0124 (0.0036)	0.0069 (0.0041)	1,79	0.125
DII	249–385	14	10	0.868(0.024)	0.0055 (-0.9898)	0.0052 (0.0022)	0.0069 (0.0047)	0,76	0.69
DIII	386–487	4	4	0.683(0.031)	0.0030 (-0,0407)	0.0037 (0.0023)	0 (0)	-	0.11

S = number of polymorphisms; H = number of haplotypes, sd = standard deviation; π = nucleotide diversity; dN = nonsynonymous substitution; dS = synonymous substitution.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471.t001>

Data analyses were performed using the FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Statistical analysis

Spearman's correlation coefficient (*rho*) was computed to examine the relationship between PvAMA1V5 and PvAMA1V16 reactivity indexes and between these variables and age, parasitemia, platelets, total lymphocytes, number of red blood cells, hematocrit and hemoglobin. To assess if *rho* was statistically different from zero, we applied t-test. Additionally, paired comparison between PvAMA1V5 and PvAMA1V16 reactivity indexes was evaluated through Wilcoxon signed-rank test. A significance level of 0.05 for all statistical tests were applied.

Results

Diversity of PvAMA1 in Brazil

A total of 40 sequences of *pvama1* from *P. vivax* isolates from Manaus were analyzed from nucleotides 1 to 1689, which corresponds to the *pvama1* full length coding sequence with *P. vivax* Sal-1(PVX_092275) as a reference sequence.

Among the 1689 nucleotides analyzed 51 SNPs were found. The overall nucleotide diversity was $\pi = 0.0062$ (Table 1). The highest pairwise diversity (π) was found at DI ($\pi = 0.0111$) followed by DII ($\pi = 0.0055$) and DIII ($\pi = 0.0030$) (Table 1). Tajima's D value was -0.4721. The entire protein and DI had a dN/dS ratio greater than 1, however, no significant differences were found (Table 1). When sequences from Manaus were compared with publish sequences from other places in the world [20, 24, 28–35], the overall nucleotide diversity was $\pi = 0.00925$ (Table 2).

Thirty-three polymorphic sites were found at the amino acid level with 12 of them being singleton sites. Twenty-nine dimorphic sites and four trimorphic sites were found (E189K/N, S228D/N, Q380K/H and V382E/K) across the PvAMA1 sequence (Fig 1A). Within the ectodomain of PvAMA1 we found 30 polymorphic sites. The majority of polymorphisms were located at DI, where 18 polymorphic sites were present followed by 8 sites at DII and 4 sites at

Table 2. Comparison of *pvama1* genetic diversity among isolates from worldwide.

Region	Number of sequences	Number of polymorphic sites	Number of haplotypes	π (Tajima's D)	Gene diversity (sd)
World	283	85	172	0.00925(-0.18579)	0.9905(0.0017)
Americas	97	45	34	0.00749(0.65952)	0.946(0.01)
Brazil*	145	27	28	0.01684(0,60764)	0.880(0.016)

Only sequences larger than 1400 bp from the World and the Americas we considered. *Brazilian partial sequences were analyzed (PvAMA1- domain I).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471.t002>

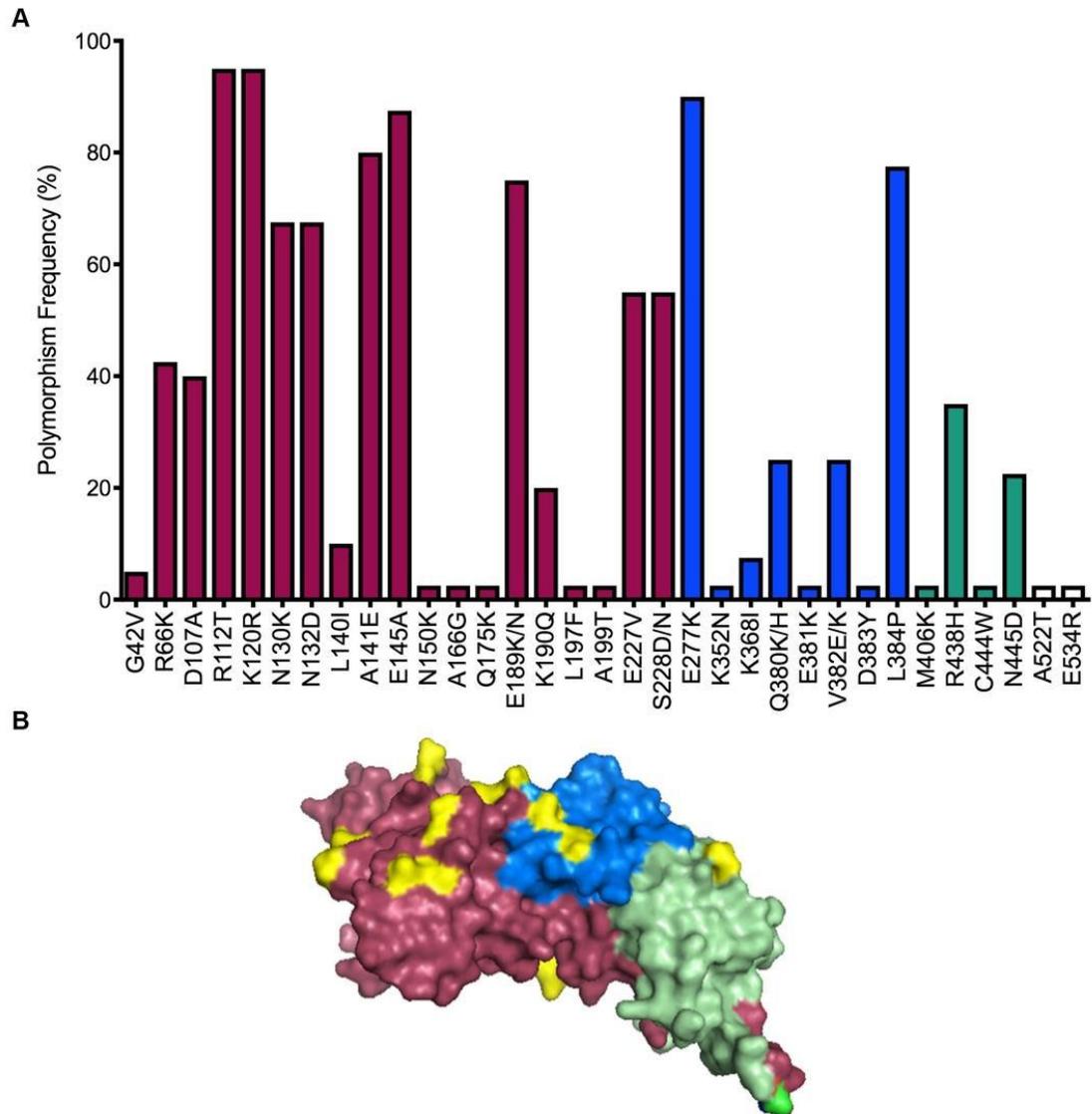


Fig 1. Frequency and location of polymorphic sites found at PvAMA1 from Brazilian isolates. A. The frequencies of polymorphic sites are represented in dark pink, blue and green bars located in DI, DII, DIII, respectively, corresponding to the ectodomain. White bars indicate amino acid changes outside the ectodomain. B. Polymorphic sites in the 3D model of the PvAMA1 ectodomain based on the crystal structure (PDB ID: 1W81). Polymorphic amino acid residues on the PvAMA1 structure located at haplotypes 5 and 16 are colored yellow. Domain I, II and III are colored in dark pink, blue and light green, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471.g001>

DIII. Although DI had the highest number of polymorphic amino acids, there was no significant difference between the frequency of polymorphic sites among the domains (Chi-square test, $p = 0.356$).

PvAMA1 haplotype frequency in Brazilian field isolates

Among the 40 isolates analyzed, 19 distinct haplotypes were found with haplotype diversity (Hd) of 0.923 (Table 1). The frequencies of each haplotype are shown in Table 3. The most frequent haplotype was H5 (22.5%). It is worth noting that 12 haplotypes were unique, with a frequency of 2.5% (Table 3). When sequences from Manaus were analyzed together with 243 published sequences from distinct geographical regions, 173 haplotypes were found. However, the most frequent haplotype found in Brazil (H5) was not found anywhere else. Published PvAMA1 sequences from Brazil are limited to DI. When this domain was evaluated 28 haplotypes were found. Sequences corresponding H5 was found also in a previous study from Brazil [34] (Table 2).

All haplotypes detected were genetically distributed in a dendrogram (S1 Fig). Two of these haplotypes were chosen to analyze the reactivity of those variants in samples from individuals from malaria-endemic regions: one haplotype with high frequency (H5 = 22.5%) and another haplotype with low frequency (H16 = 2.5%).

Several mutation points are located at B-cell epitopes

Predicted B-cell epitopes are listed in S1 Table. Twenty-two predicted linear B-cell epitopes were found across PvAMA1, with 10 containing at least one polymorphic site. Among the 33 polymorphic sites found at PvAMA1, 20 sites are located at predicted B-cell epitopes and 12 amino acid changes are located in H5 and H16 as shown in the 3D model in Fig 1B.

Haplotypes 5 and 16 differed in 12 polymorphic sites across the ectodomain. Nine polymorphic sites were located in DI, two sites in DII and only one in DIII. Among those sites, seven sites are located in predicted B-cell epitopes (S1 Table, Fig 1B).

Antibody responses differ depending on haplotype

Recombinant proteins were characterized in terms of purity and quality by SDS-PAGE and structure by CD analysis (S2 Fig). The CD spectra suggest a higher presence of α -helical characterized by two negative bands of similar magnitude, and a positive band at ~ 190 nm [42]. The same global secondary structure pattern was visualized when PvAMA1V5 and PvAMA1V16 proteins were compared.

To understand the importance of sequence variability, IgG responses towards both variants were evaluated in a subset of the population previously characterized for genetic diversity. Most of the population from Manaus (87.9%) had antibodies against PvAMA1V5 and 60.6% had antibodies towards PvAMA1V16. All patients who had antibodies to PvAMA1V16 also had antibodies to PvAMA1V5 (Fig 2).

All samples that contained haplotype PvAMA1H5 ($n = 9$) also had antibodies recognizing this sequence (PvAMA1V5). Nevertheless, only 5 out of 9 of individuals containing PvAMA1H5 had antibodies against PvAMA1V16 (Fig 2). On the other hand, the individual infected with PvAMA1H16 parasites had antibodies to both variants, however with higher reactivity against PvAMA1V5 in most cases ($p < 0.001$ for Wilcoxon signed-rank test, Fig 3A). The antibody response against both variants was strongly correlated (Spearman test, $\rho = 0.867$ and $p < 0.0001$) (Fig 3B).

Although the sample size was notably limited, individuals infected with parasites belonging to haplotypes H2, H6 and H14 had no antibodies to either of the variants analyzed. Individuals infected with H7, H13 and H18 did not have antibodies to PvAMA1V16. On the other hand, individuals infected with parasites containing H1, H10, H11, H15, H16 and H19 had antibodies towards PvAMA1V5 as well as PvAMA1V16.

Table 3. Polymorphic sites across each haplotype and the presence of predicted linear B-cell epitopes on variant PvAMA1 sites.

H/AA PvAMA1	H(%)	Amino acid residue (position)																																			
		G (42)	R (66)	D (107)	R (112)	R (120)	N (130)	N (132)	L (140)	A (141)	E (145)	N (150)	A (166)	Q (175)	E (189)	K (190)	L (197)	A (199)	E (227)	S (234)	E (277)	K (352)	K (368)	Q (380)	E (381)	V (382)	D (383)	I (384)	M (406)	R (430)	C (444)	N (445)	A (522)	E (534)			
H1	7.50	-	-	-	T	R	K	D	-	E	A	-	-	-	N	-	-	-	V	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	2.50	-	-	-	T	R	K	D	-	E	A	-	-	-	N	-	-	-	V	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H3	10.00	-	-	-	T	R	K	D	-	E	A	-	-	-	N	-	-	-	V	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H4	2.50	-	-	-	T	R	K	D	-	E	A	-	-	-	N	-	-	-	V	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H5	22.50	-	-	-	T	R	K	D	-	E	A	-	-	-	N	-	-	-	V	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H6	5.00	-	-	-	T	R	K	D	-	E	A	-	-	-	N	-	-	-	V	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H7	2.50	-	-	-	T	R	K	D	-	E	A	-	-	-	N	-	-	-	V	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H8	2.50	-	-	-	T	R	K	D	-	E	A	-	-	-	N	-	-	-	V	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H9	7.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	-	-	-	V	N	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H10	2.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	-	-	-	K	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H11	2.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	-	-	-	K	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H12	12.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	-	-	-	K	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H13	2.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	Q	-	-	K	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H14	2.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	Q	-	-	K	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H15	2.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	Q	F	T	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H16	2.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	Q	-	-	K	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H17	2.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	Q	-	-	K	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H18	2.50	-	-	-	K	A	T	R	K	D	-	-	-	-	K	Q	-	-	K	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H19	5.00	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

H = n° of haplotypes; AA = amino acid; DI = domain I (dark blue); DII = domain II (dark blue); DIII = domain III (dark green). Amino acids position colored in light blue indicate predicted B cell epitopes. Orange and gray amino acids represent mutation points and conserved positions between H5 and H16 sequences respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471.t003>

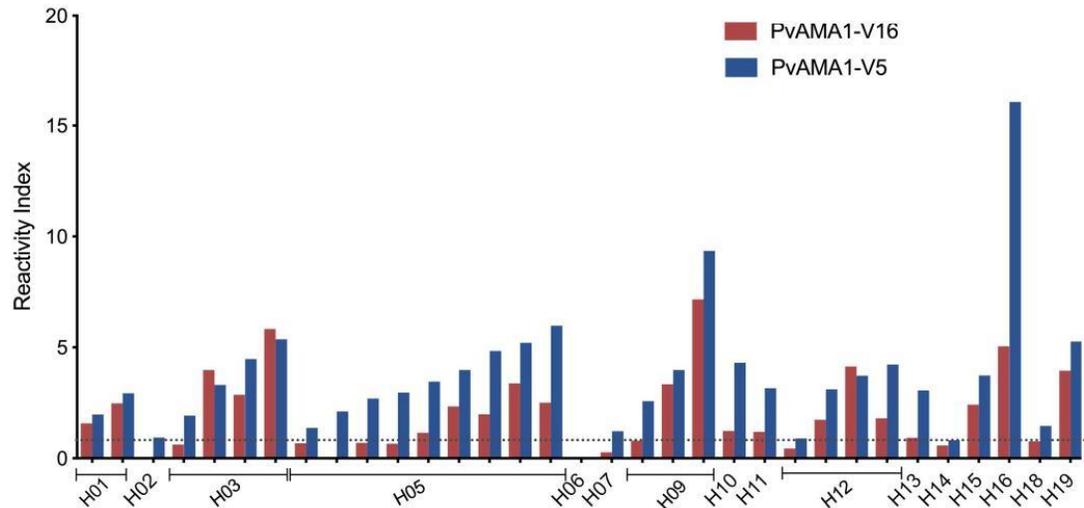


Fig 2. Antibody response against variants 5 and 16 of individuals from Manaus infected with distinct PvAMA1 variants. Each bar represents the reactivity index of a particular patient infected by a given haplotype. Colors blue and red indicate IgG antibodies against PvAMA1V5 and PvAMA1V16 respectively. Reactivity indexes higher than 1 are positive and visualized above the dotted line.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471.g002>

The correlation of antibody response with hematological parameters and age was also analyzed. The number of lymphocytes presented a moderate positive correlation with the antibody response against PvAMA1V5 (Fig 4A, $\rho = 0.408$ and $p = 0.010$) and PvAMA1V16 (Fig 4A, $\rho = 0.318$ and $p = 0.038$). While a moderate negative correlation was observed between the immune reactivity and neutrophils (S3B Fig, PvAMA1V5 $\rho = -0.339$ $p = 0.027$ and PvAMA1V16 $\rho = -0.299$ $p = 0.045$). However, no other association was found when hematocrit, platelets, total number of white blood cells or age were analyzed (Fig 4C).

Antibody responses to PvAMA1 variants are maintained in the absence of *P. vivax* infection

The importance of these polymorphisms for antibody response was also evaluated in a geographically distinct population in Itaituba, state of Pará. Among the 171 individuals evaluated, 70.8% ($n = 121$) had antibodies to PvAMA1V5 and 50.3% ($n = 86$) had antibodies to PvAMA1V16 (S3 Fig). The higher reactivity index was against PvAMA1V5 for most individuals ($p < 0.0001$ for Wilcoxon signed-rank test), 81/171 (47.4%) individuals had antibodies to both variants while 45/171 (26.3%) of the studied population had no antibodies to these variants.

In the infected group, 51.9% ($n = 41$) had antibodies to both variants while 29.1% ($n = 23$) had no antibodies to either variant. In this population, 65.8% ($n = 52$) of individuals had an immune response against PvAMA1V5 and 57% ($n = 45$) against PvAMA1V16. In the noninfected population, 43.5% ($n = 40$) had antibodies to both variants, and 23.9% ($n = 22$) of individuals did not have antibodies to either variant. In this group, 75% ($n = 69$) had antibodies against PvAMA1V5 while 44.6% ($n = 41$) had antibodies against PvAMA1V16 (Fig 5). Similar to individuals from Manaus, in this population, there was a strong correlation between the antibody response towards both variants (S3B, S4A and S4C Figs).

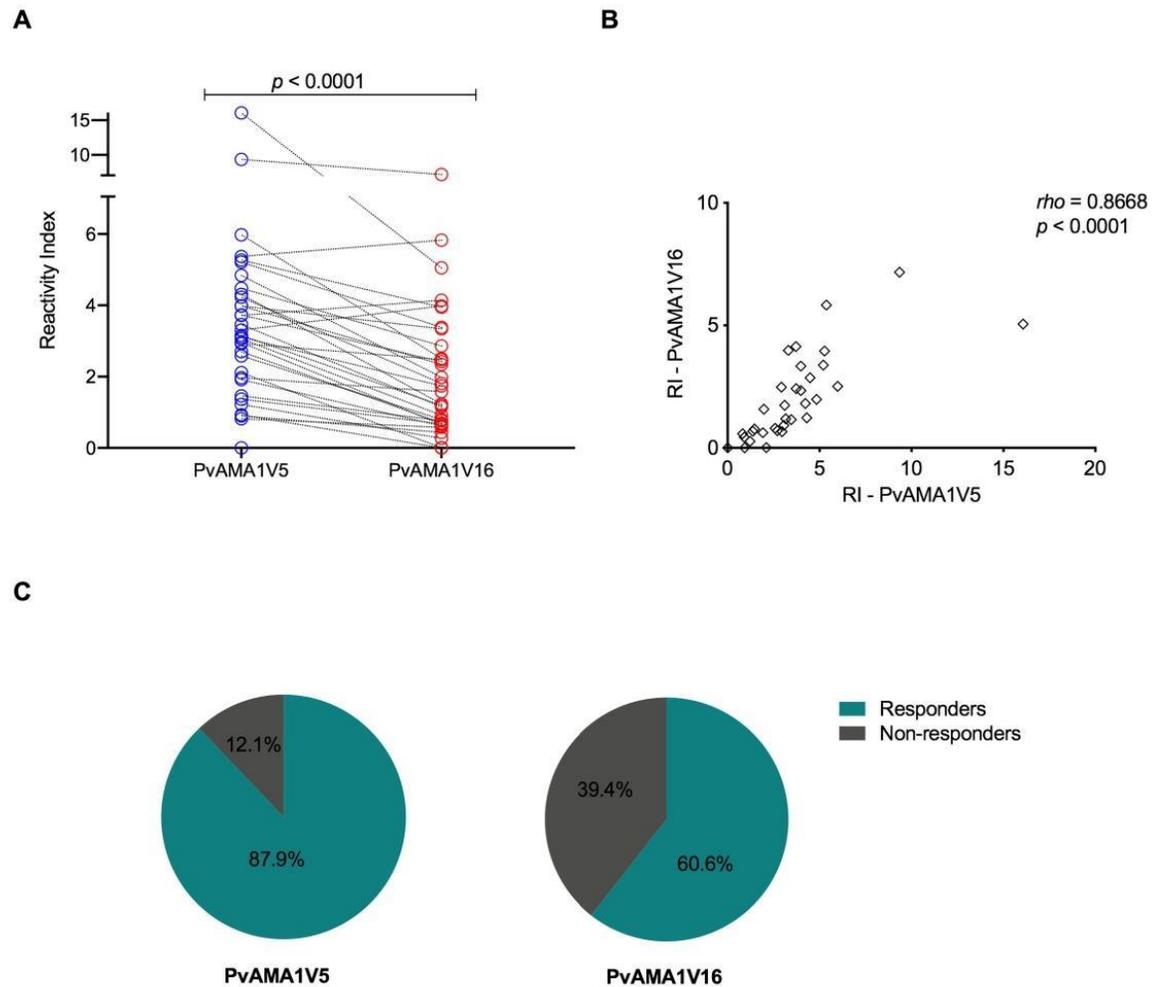


Fig 3. Correlation and paired comparison of antibody responses to PvAMA1 variants from Manaus. Reactivity indexes of A) Paired PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG responses comparison (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.0001$). B) Spearman correlation coefficient (ρ) between PvAMA1V5 and PvAMA1V16 reactivity indexes and t-test p-value (p), C) Prevalence of responders to PvAMA1V5 and PvAMA1V16.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471.g003>

In analysis including all individuals from Itaituba sample, PvAMA1V5 antibody response presented a weak but statistically significant positive correlation with age ($\rho = 0.249$ and $p = 0.001$); for PvAMA1V16 antibody response, this correlation was lower and with no statistical significance at 0.05 level ($\rho = 0.117$ and $p = 0.064$). When the analyses were performed according to infected and noninfected groups, similar results were observed, with statistical significance only for correlation between PvAMA1V5 antibody response and age for the latter group ($\rho = 0.2913$ and $p = 0.0024$) (S5 Fig). No correlation was found between the plasma cytokine level and the PvAMA1 antibody response (S6 Fig).

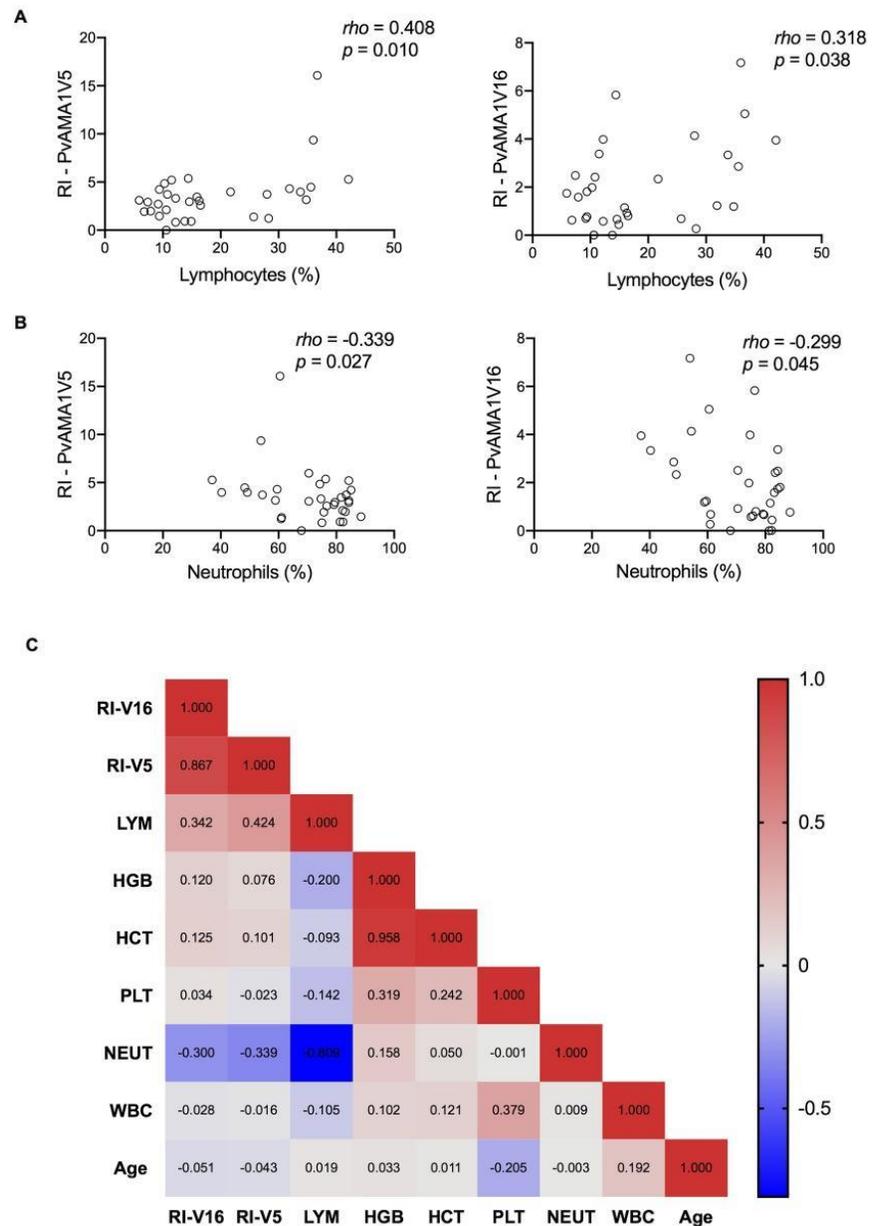


Fig 4. Correlation between hematological parameters and reactivity indexes of individuals from Manaus. A) Spearman correlation coefficient (ρ) and t-test p-value (p) between reactivity indexes and lymphocytes frequency, B) ρ and p between reactivity indexes and neutrophils and C) Spearman correlation matrix of hematological parameters, age and reactivity indexes. Scale is based on colors from blue (perfect positive correlation, 1) to red (perfect negative correlation, -1). Each line represents one variable.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471.g004>

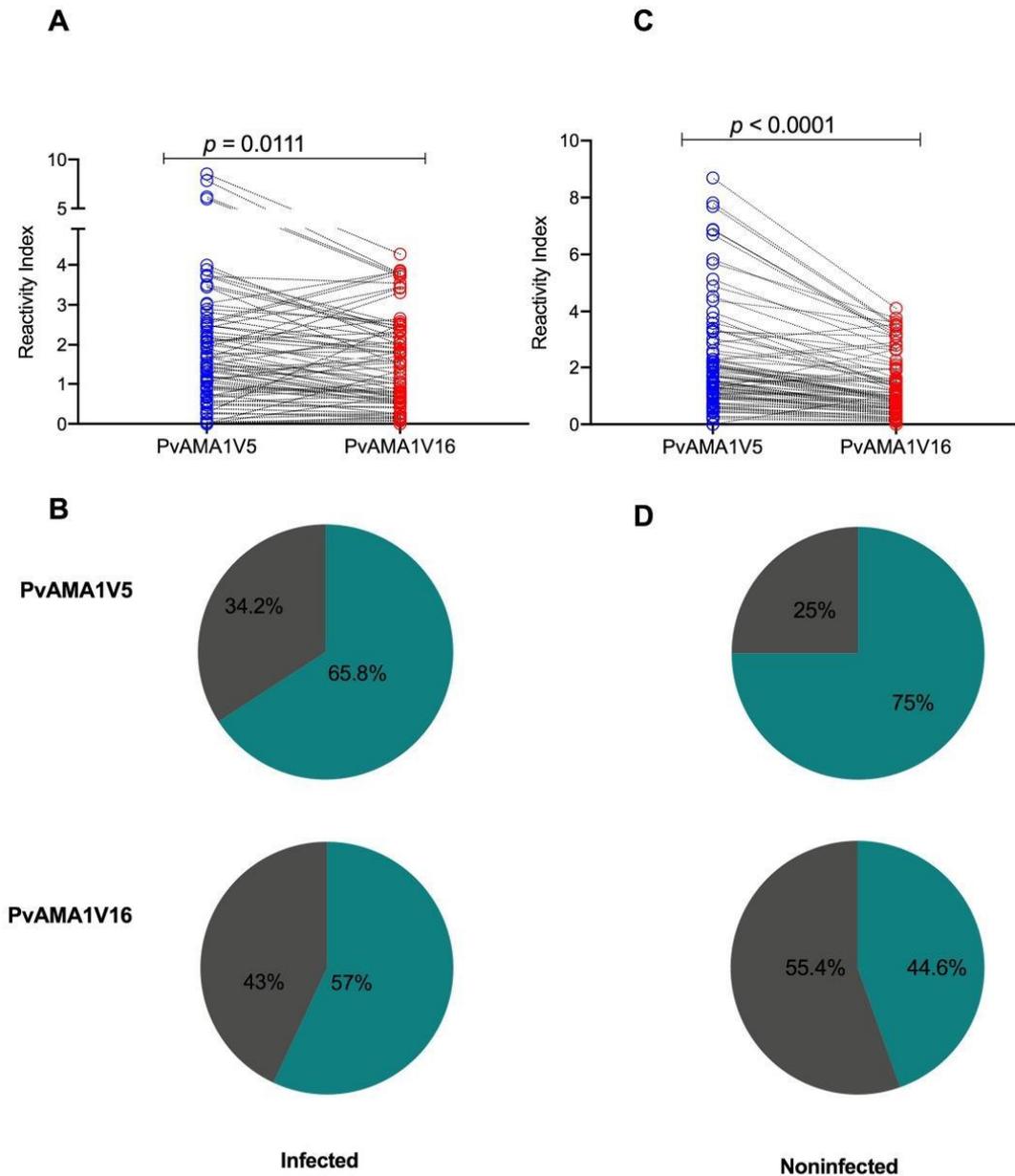


Fig 5. Paired comparison of antibody response to PvAMA1 variants in infected and noninfected individuals from Itaituba. A) Paired PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG responses comparison in infected individuals (Wilcoxon signed-rank test p-value). B) Prevalence of responders towards both variants in infected group. C) PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG responses comparison in noninfected individuals (Wilcoxon signed-rank test p-value). D) Prevalence of immune responses in noninfected individuals.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471.g005>

Discussion

AMA1 plays an essential role in erythrocyte invasion and is one of the major potential vaccine candidates against malaria. This protein is exposed to the immune system and is capable of inducing an antibody response that blocks parasite invasion into host cells [43, 44]. A major challenge in the development of an efficient malaria vaccine is the presence of high levels of polymorphisms in the parasite antigens that are under immune pressure. Strain-specific immunity could enable parasites to escape vaccine-induced antibodies [45]. In this study, polymorphisms in the PvAMA1 antigen from Brazilian *P. vivax* isolates were identified and the influence of two different PvAMA1 variants was evaluated for the specific antibody responses.

In this study, 18 amino acid changes sites were identified in PvAMA1 DI, 8 sites in DII and 4 sites in DIII compared to PvAMA1 (Sal-1 strain). The highest degree of polymorphism was found in DI, as previously observed in *P. vivax* isolates [24, 46]. In addition to being the most polymorphic domain [19, 47, 48] DI also contains the binding site to RON2, which acts in actin-myosin-associated moving junction formation. RON2 binds to a conserved portion of AMA1 [49] that is surrounded by highly polymorphic regions [50]. Therefore, DI is considered an important region for antibody response, while DII is considered to be the most immunogenic both in *P. falciparum* [51] and *P. vivax* [17].

B-cell epitopes were predicted on the protein structure by taking into account the importance of SNP localization to the immune response and selective pressure [52]. Notably, most polymorphic sites were found in regions of B-cell epitopes. Since polymorphisms are found predominantly on the exposed protein surface [52], amino acid changes at B-cell epitope sites may directly affect the antibody response because mutations may inhibit binding and hinder the generation of immunological memory.

Five mutations were detected at DI and two at DII, localized at B-cell epitopes in H5 or H16. Although the consequences of these mutations in each variant are not known, it is important to consider that changes in protein sequence can affect the immunorecognition of those epitopes.

AMA 1 is one of the *Plasmodium* antigens with the highest vaccine potential [53]. Studies have shown that vaccine formulations containing AMA1 are able to produce antibodies and induce protection in rodent and primate models [15, 16, 54, 55]. Numerous trials have already been conducted to show the effectiveness of this candidate in a falciparum malaria vaccine [53]. AMA1 is the most studied blood-stage vaccine candidate; however, only FMP2.1/AS02A has shown efficacy in clinical trials [56].

Immunization with only one allele may not protect against parasites expressing different AMA1 alleles [57, 58]. Plasma from humans exposed to *P. falciparum* were tested against different AMA1 alleles. Most individuals had not only a specific response to conserved regions but also raised specific antibodies against polymorphic regions of the antigen [58]. In addition, immunization of rabbits with the PfAMA1 containing an allele that is capable of blocking the growth of homologous parasites does not inhibit the heterologous parasite strain [57]. This fact suggests that these genetic differences are a result of immune pressure and modifications in alleles may impair recognition of B-cell epitopes by elicited antibodies. Therefore, it is important not only to characterize the genetic diversity of the antigen but also to identify its immunogenic potential to enable a vaccine strategy to include a multiple-allelic variant to obtain a strong and effective response.

In this instance, the immunoassay results showed that the variants of PvAMA1 (V5 and V16) are highly reactive. However, a greater naturally acquired immune response against PvAMA1V5 was found among different haplotypes in individuals from Manaus, including the isolate belonging to H16. Manaus is a low transmission region. Furthermore, the naturally

acquired immune response was also analyzed in a population from gold mining areas, representing a high endemic area. The prevalence of antibodies against PvAMA1V5 is higher in Manaus compared to Itaituba. Since the haplotypes were identified in samples from Manaus, the immune response of individuals living in this region would be higher due to circulating target strains. On the other hand, H5 is probably not distributed with the same frequency in Itaituba. This possibility highlights the importance of vaccine formulations containing frequent haplotypes from different malaria endemic areas. The high immunogenicity of AMA1 for most individuals exposed to *P. falciparum* and *P. vivax* during natural malaria infection was also observed in earlier studies [59].

The immune response of infected individuals was also compared to noninfected individuals who had previous episodes of malaria. Interestingly, although there was no significantly higher prevalence of antibodies in either group, noninfected individuals had a higher IgG reactivity index compared to infected patients. Thus, a possible maturation of the immune system over time can be inferred.

In addition, individuals from Itaituba showed a statistically significant correlation between PvAMA1V5 reactivity index and age. Nevertheless, the correlation between age and PvAMA1V16 reactivity index was not statistically significant. This correlation has been previously described for several *Plasmodium* antigens [60–63] and suggests age-dependent immunity, since there is evidence that individuals living in malaria-endemic regions have increased immune responses according to the number of reinfections [59] and become clinically immune after multiple malaria episodes [64]. In the individuals from Manaus, no statistically significant correlation was found between age and reactivity index for any of the variants either due to sample size or to the region of residence. Itaituba is a gold mining region with a high number of cases and consequently has a greater exposure to the parasite compared to the individuals living in Manaus, where the incidence of malaria is lower.

For vivax malaria, there are few studies to date testing PvAMA1 as a vaccine candidate [65–67]. A vaccination regimen with PvAMA1 presented promising results, showing the ability to elicit long-lasting PvAMA1-specific antibody responses, as well as memory T cell responses, in mice [67]. This vaccine was also able to elicit invasion inhibitory antibodies against diverse *P. vivax* strains [65]. However, the most promising studies testing AMA1 formulations for both falciparum malaria in humans, demonstrating 64% efficacy against vaccine-like strains, and for vivax malaria in monkeys, did not provide significant overall protection and showed a probable limitation related to the extensive polymorphisms of AMA1. This property could induce antibodies that show limited cross-inhibition of parasites expressing other variants [56, 66].

Multi-allele vaccine inducing a broad inhibitory antibody response are aimed at an effective malaria vaccine. Therefore, we suggest that vaccine trials based on polymorphic antigens be designed considering strain frequencies at individual study sites. The high reactivity and the possible maintenance of the immune response over time indicate that PvAMA1V5 may be a promising component of a vaccine formulation.

Supporting information

S1 Fig. Dendrogram of phylogenetic relationships between haplotypes of *pvama1* in Manaus.

(TIF)

S2 Fig. Characterization of recombinant proteins PvAMA1V5 and PvAMA1V16.

SDS-PAGE analysis of ~77kDa rPvAMA1V5 and PvAMA1V16 stained with Coomassie Brilliant Blue. B) Circular Dichroism spectra of PvAMA1 variants. Dotted line (PvAMA1V16) and

solid line (PvAMA1V5). MM: Molecular marker PageRuler Prestained Protein Ladder, 10-180kDa (Thermo Scientific).
(TIF)

S3 Fig. Correlation and paired comparison of naturally acquired immune responses to PvAMA1 variants from the Itaituba population. A) Paired PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG responses comparison (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.0001$, $n = 171$). B) Spearman correlation coefficient (ρ) of IgG antibodies against each PvAMA1 variant and t-test p-value (p). C) Prevalence of responders and non-responders towards PvAMA1V5 and PvAMA1V16.
(TIF)

S4 Fig. Correlation between immune responses to PvAMA1 haplotypes in distinct groups from Itaituba. A) Spearman correlation coefficient (ρ) between PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG antibodies and t-test p-value (p) against each variant in acutely infected individuals. B) Prevalence of immune response towards PvAMA1 variants in infected individuals, C) ρ between PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG antibodies and t-test p-value (p) in noninfected individuals. D) Prevalence of immune response towards PvAMA1 variants in noninfected individuals.
(TIF)

S5 Fig. Correlation between age and antibody response towards to PvAMA1 variants. A) Spearman Correlation coefficient (ρ) between PvAMA1 variants reactivity indexes and age from full Itaituba sample. B) ρ between PvAMA1 variants reactivity indexes and age for infected individuals, C) ρ between PvAMA1 variants reactivity indexes and age for noninfected individuals. T-test p-value (p).
(TIF)

S6 Fig. Multivariate correlation coefficient in infected and noninfected individuals from Itaituba. A) Correlation matrix of the infected group. B) Correlation matrix of the noninfected group. Positive correlations are represented with red, and negative correlations are represented with blue squares. Pearson correlation was applied to verify associations between the PvAMA1 variant reactivity index and hemoglobin, hematocrit, platelets and plasmatic cytokines (IFN- γ , IL6, IL10, IL2, IL4, TNF- α). $p < 0.05$ was considered significant. r values are indicated in the figure.
(TIF)

S1 Table. Predicted linear B-cell epitopes and mutation sites based on the PvAMA1 reference sequence comparing PvAMA1 haplotypes. Amino acids colored red indicate polymorphisms.
(DOCX)

Acknowledgments

We want to express our gratitude to the people who agreed to participate in this study, to the field team at *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD) in Manaus and Universidade Federal do Pará. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS FIOCRUZ at the Carlos Chagas Institute, Fiocruz-Paraná, Brazil. In addition, we acknowledge Liam King for his diligent proofreading of this paper.

Author Contributions

Conceptualization: Letusa Albrecht.

Data curation: Najara Carneiro Bittencourt, Letusa Albrecht.

Formal analysis: Najara Carneiro Bittencourt, Ana Beatriz Iung Enembreck da Silva, Natália Silveira Virgili, João Henrique D. B. Gervásio, João Luiz Silva-Filho, Hellen Geremias dos Santos, Letusa Albrecht.

Funding acquisition: Letusa Albrecht.

Investigation: Najara Carneiro Bittencourt, Ana Beatriz Iung Enembreck da Silva, Letusa Albrecht.

Methodology: Najara Carneiro Bittencourt, Ana Beatriz Iung Enembreck da Silva, Natália Silveira Virgili, Ana Paula Schappo, Tamirys S. Pimenta, Mario A. Kujbida Junior, Ana Maria R. S. Ventura, Rosana M. F. Libonati, Stefanie C. P. Lopes, Ricardo L. D. Machado, Fabio T. M. Costa, Letusa Albrecht.

Project administration: Letusa Albrecht.

Supervision: Letusa Albrecht.

Validation: Ana Beatriz Iung Enembreck da Silva, Mario A. Kujbida Junior.

Visualization: Ana Beatriz Iung Enembreck da Silva.

Writing – original draft: Najara Carneiro Bittencourt, Letusa Albrecht.

Writing – review & editing: Najara Carneiro Bittencourt, Ana Beatriz Iung Enembreck da Silva, Natália Silveira Virgili, Ana Paula Schappo, João Henrique D. B. Gervásio, Tamirys S. Pimenta, Mario A. Kujbida Junior, Ana Maria R. S. Ventura, Rosana M. F. Libonati, João Luiz Silva-Filho, Hellen Geremias dos Santos, Stefanie C. P. Lopes, Marcus V. G. Lacerda, Ricardo L. D. Machado, Fabio T. M. Costa, Letusa Albrecht.

References

- Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol.* 2012; 42(12):1099–105. Epub 2012/10/02. S0020-7519(12)00221-4 [pii] 10.1016/j.ijpara.2012.08.007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.007> PMID: 23022617.
- Saúde Md. 2019 [cited 2019 26 August]. Available from: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&hiddensections=header%2Cpath%2CdockTop%2CdockLeft%2Cfooter&documentID=90C3B224FFA8421F335769827F2A96E&Server=srvbipdf03&Project=DMMalaria&>.
- Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(11):4075–83. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4075-4083.2004> PMID: 15504824; PubMed Central PMCID: PMC525399.
- Mueller I, Shakri AR, Chitnis CE. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine.* 2015; 33(52):7489–95. Epub 2015/10/01. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.060> PMID: 26428453.
- Beeson JG, Kurtovic L, Dobaño C, Opi DH, Chan JA, Feng G, et al. Challenges and strategies for developing efficacious and long-lasting malaria vaccines. *Sci Transl Med.* 2019; 11(474). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau1458> PMID: 30626712.
- Triglia T, Healer J, Caruana SF, Hodder AN, Anders RF, Crabb BS, et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol.* 2000; 38(4):706–18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02175.x> PMID: 11115107.
- Dutta S, Haynes JD, Moch JK, Barbosa A, Lanar DE. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(21):12295–300. Epub 2003/10/02. <https://doi.org/10.1073/pnas.2032858100> PMID: 14526103; PubMed Central PMCID: PMC218752.
- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 2005; 1(2):

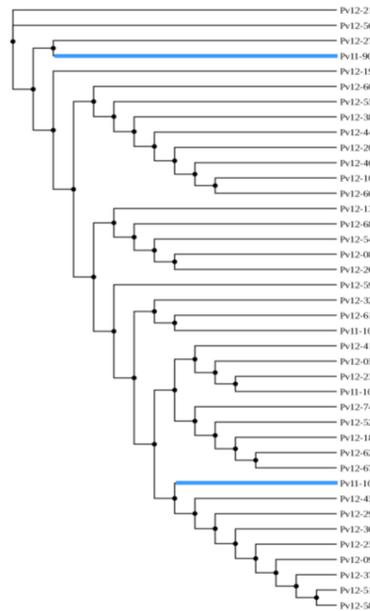
- e17. Epub 2005/10/21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017> PMID: 16244709; PubMed Central PMCID: PMC1262624.
9. Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem*. 2004; 279(10):9490–6. Epub 2003/12/15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311331200> PMID: 14676185.
 10. Mital J, Meissner M, Soldati D, Ward GE. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol Biol Cell*. 2005; 16(9):4341–9. Epub 2005/07/06. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0281> PMID: 16000372; PubMed Central PMCID: PMC1196342.
 11. Wright GJ, Rayner JC. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. *PLoS Pathog*. 2014; 10(3):e1003943. Epub 2014/03/20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003943> PMID: 24651270; PubMed Central PMCID: PMC3961354.
 12. Macrailld CA, Anders RF, Foley M, Norton RS. Apical membrane antigen 1 as an anti-malarial drug target. *Curr Top Med Chem*. 2011; 11(16):2039–47. <https://doi.org/10.2174/156802611796575885> PMID: 21619512.
 13. Sirima SB, Durier C, Kara L, Houard S, Gansane A, Loulergue P, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1-DiCo malaria vaccine adjuvanted with GLA-SE or Alhydrogel® in European and African adults: A phase 1a/1b, randomized, double-blind multi-centre trial. *Vaccine*. 2017; 35(45):6218–27. Epub 2017/09/22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.027> PMID: 28947345.
 14. Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, Mitchell GH. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol*. 1988; 10(5):535–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1988.tb00241.x> PMID: 3194149.
 15. Collins WE, Pye D, Crewther PE, Vandenberg KL, Galland GG, Sulzer AJ, et al. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 51(6):711–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.711> PMID: 7810803.
 16. Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, Anders RF. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun*. 1996; 64(8):3310–7. PMID: 8757869; PubMed Central PMCID: PMC174223.
 17. Múfalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FT, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes Infect*. 2008; 10(12–13):1266–73. Epub 2008/07/22. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.023> PMID: 18692152.
 18. Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*. 2005; 308(5720):408–11. Epub 2005/02/24. <https://doi.org/10.1126/science.1107449> PMID: 15731407.
 19. Garg S, Alam MT, Das MK, Dev V, Kumar A, Dash AP, et al. Sequence diversity and natural selection at domain I of the apical membrane antigen 1 among Indian *Plasmodium falciparum* populations. *Malar J*. 2007; 6:154. Epub 2007/11/22. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-154> PMID: 18031585; PubMed Central PMCID: PMC2211494.
 20. Zakeri S, Sadeghi H, Mehrizi AA, Djadid ND. Population genetic structure and polymorphism analysis of gene encoding apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Acta Trop*. 2013; 126(3):269–79. Epub 2013/03/04. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.02.017> PMID: 23467011.
 21. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med*. 2002; 72:189–203. <https://doi.org/10.1385/1-59259-271-6:189> PMID: 12125116.
 22. Reicht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. 2017; 16(1):273. Epub 2017/07/04. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6> PMID: 28676055; PubMed Central PMCID: PMC5496604.
 23. Kirsten Moll IL, Hedvig Perlmann, Wahlgren ASaM. *Methods in Malaria Research*.
 24. Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE, Ganguli I, Perera L, Premaratne PH, et al. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol*. 2007; 24(4):939–47. Epub 2007/01/22. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm013> PMID: 17244598.
 25. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998; 8(3):186–94. PMID: 9521922.
 26. Staden R, Beal KF, Bonfield JK. The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol*. 2000; 132:115–30. Epub 1999/11/05. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115> PMID: 10547834.

27. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33(7):1870–4. Epub 2016/03/22. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> PMID: 27004904.
28. Putapontip C, Jongwutiwes S, Grynberg P, Cui L, Hughes AL. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(6):1295–300. Epub 2009/07/28. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.005> PMID: 19643205; PubMed Central PMCID: PMC2790030.
29. Muehlenbein MP, Pacheco MA, Taylor JE, Prall SP, Ambu L, Nathan S, et al. Accelerated diversification of nonhuman primate malarial parasites in Southeast Asia: adaptive radiation or geographic speciation? *Mol Biol Evol.* 2015; 32(2):422–39. Epub 2014/11/10. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu310> PMID: 25389206; PubMed Central PMCID: PMC4298170.
30. Cheng Q, Saul A. Sequence analysis of the apical membrane antigen I (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 65(1):183–7. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90127-9) PMID: 7935625.
31. Rajesh V, Elamaran M, Vidya S, Gowrishankar M, Kochar D, Das A. *Plasmodium vivax*: genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. *Exp Parasitol.* 2007; 116(3):252–6. Epub 2007/01/23. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.006> PMID: 17336299.
32. Arnott A, Mueller I, Ramsland PA, Siba PM, Reeder JC, Barry AE. Global Population Structure of the Genes Encoding the Malaria Vaccine Candidate, *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA1). *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(10):e2506. Epub 2013/10/31. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002506> PMID: 24205419; PubMed Central PMCID: PMC3814406.
33. Ord RL, Tami A, Sutherland CJ. ama1 genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. *PLoS One.* 2008; 3(10):e3366. Epub 2008/10/10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003366> PMID: 18846221; PubMed Central PMCID: PMC2559863.
34. Grynberg P, Fontes CJ, Hughes AL, Braga EM. Polymorphism at the apical membrane antigen 1 locus reflects the world population history of *Plasmodium vivax*. *BMC Evol Biol.* 2008; 8:123. Epub 2008/04/29. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-123> PMID: 18445274; PubMed Central PMCID: PMC2394524.
35. Grynberg P, Fernandes Fontes CJ, Braga EM. Association between particular polymorphic residues on apical membrane antigen 1 (AMA-1) and platelet levels in patients with *vivax* malaria. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13(11):1089–94. Epub 2007/08/29. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01815.x> PMID: 17727669.
36. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* 1986; 3(5):418–26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410> PMID: 3444411.
37. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*: Academic Press; 1969. p. 21–132.
38. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcattili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(W1):W24–W9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346> PMID: 28472356; PubMed Central PMCID: PMC5570230.
39. Schrödinger L. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.2r3pre].
40. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1751(2):119–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005> PMID: 16027053.
41. Bittencourt NC, Leite JA, Silva ABIE, Pimenta TS, Filho JL, Cassiano GC, et al. Genetic sequence characterization and naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* Rhoptry Neck Protein 2 (PvRON2). *Malar J.* 2018; 17(1):401. Epub 2018/10/31. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2543-7> PMID: 30382855; PubMed Central PMCID: PMC6208078.
42. Corrêa D, Ramos C. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research.* 2009:164–73.
43. Kocken CH, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, van der Wel A, Hackett F, Valderrama A, et al. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun.* 2002; 70(8):4471–6. <https://doi.org/10.1128/iai.70.8.4471-4476.2002> PMID: 12117958; PubMed Central PMCID: PMC128198.
44. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun.* 2001; 69(5):3286–94. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3286-3294.2001> PMID: 11292751; PubMed Central PMCID: PMC98287.
45. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Batchelor AH, Cummings MP, Escalante AA, et al. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci*

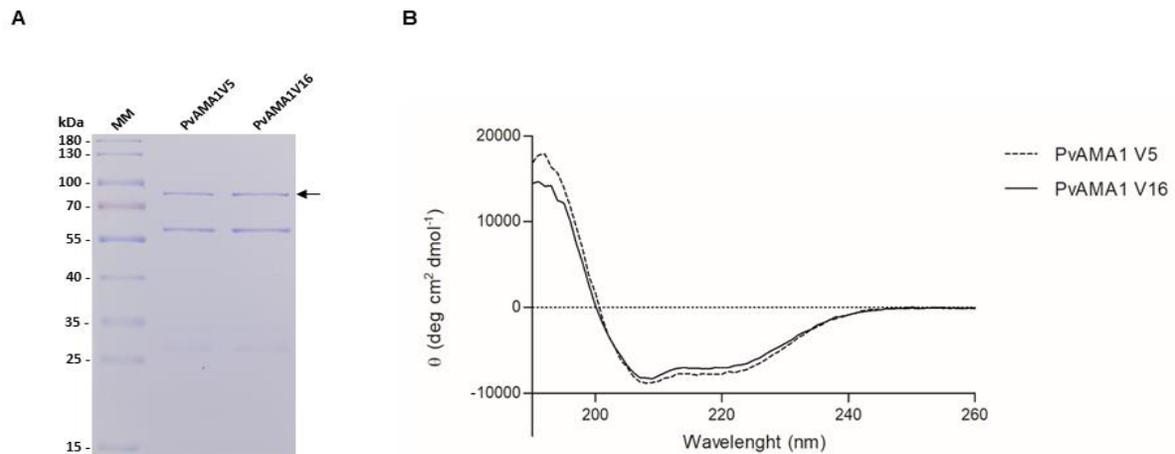
- Transl Med. 2009; 1(2):2ra5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000257> PMID: 20165550; PubMed Central PMCID: PMC2822345.
46. Moon SU, Na BK, Kang JM, Kim JY, Cho SH, Park YK, et al. Genetic polymorphism and effect of natural selection at domain I of apical membrane antigen-1 (AMA-1) in *Plasmodium vivax* isolates from Myanmar. *Acta Trop.* 2010; 114(2):71–5. Epub 2010/01/21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.006> PMID: 20096258.
 47. Cortés A, Mellombo M, Mueller I, Benet A, Reeder JC, Anders RF. Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA1. *Infect Immun.* 2003; 71(3):1416–26. <https://doi.org/10.1128/iai.71.3.1416-1426.2003> PMID: 12595459; PubMed Central PMCID: PMC148836.
 48. Vulliez-Le Normand B, Saul FA, Hoos S, Faber BW, Bentley GA. Cross-reactivity between apical membrane antigen 1 and rhoptry neck protein 2 in *P. vivax* and *P. falciparum*: A structural and binding study. *PLoS One.* 2017; 12(8):e0183198. Epub 2017/08/17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183198> PMID: 28817634; PubMed Central PMCID: PMC5560645.
 49. Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, Blackman MJ. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathog.* 2009; 5(1):e1000273. Epub 2009/01/23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000273> PMID: 19165323; PubMed Central PMCID: PMC2621342.
 50. Guy AJ, Irani V, Richards JS, Ramsland PA. Structural patterns of selection and diversity for *Plasmodium vivax* antigens DBP and AMA1. *Malar J.* 2018; 17(1):183. Epub 2018/05/02. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2324-3> PMID: 29720179; PubMed Central PMCID: PMC5930944.
 51. Lalitha PV, Ware LA, Barbosa A, Dutta S, Moch JK, Haynes JD, et al. Production of the subdomains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 ectodomain and analysis of the immune response. *Infect Immun.* 2004; 72(8):4464–70. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4464-4470.2004> PMID: 15271904; PubMed Central PMCID: PMC470679.
 52. Bai T, Becker M, Gupta A, Strike P, Murphy VJ, Anders RF, et al. Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(36):12736–41. Epub 2005/08/29. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501808102> PMID: 16129835; PubMed Central PMCID: PMC1200259.
 53. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol.* 2008; 24(2):74–84. Epub 2008/01/15. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.002> PMID: 18226584.
 54. Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, et al. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine.* 1998; 16(2–3):240–7. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)88331-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)88331-4) PMID: 9607037.
 55. Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, Holder AA. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. *Infect Immun.* 2000; 68(5):2899–906. <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.2899-2906.2000> PMID: 10768987; PubMed Central PMCID: PMC97502.
 56. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Ouattara A, Kone AK, et al. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N Engl J Med.* 2011; 365(11):1004–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008115> PMID: 21916638; PubMed Central PMCID: PMC3242358.
 57. Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, Miles AP, Chitsaz F, Saul A, et al. In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun.* 2002; 70(12):6948–60. <https://doi.org/10.1128/iai.70.12.6948-6960.2002> PMID: 12438374; PubMed Central PMCID: PMC133034.
 58. Cortés A, Mellombo M, Masciantonio R, Murphy VJ, Reeder JC, Anders RF. Allele specificity of naturally acquired antibody responses against *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun.* 2005; 73(1):422–30. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.422-430.2005> PMID: 15618180; PubMed Central PMCID: PMC538974.
 59. Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Cômodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol.* 2005; 35(2):185–92. Epub 2004/12/19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.11.003> PMID: 15710439.
 60. Baird JK. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998; 92(4):367–90. <https://doi.org/10.1080/00034989859366> PMID: 9683890.
 61. Amoah LE, Nuvor SV, Obboh EK, Acquah FK, Asare K, Singh SK, et al. Natural antibody responses to *Plasmodium falciparum* MSP3 and GLURP(R0) antigens are associated with low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1):395. Epub 2017/08/

23. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2338-7> PMID: 28835262; PubMed Central PMCID: PMC5569498.
62. Patel P, Bharti PK, Bansal D, Raman RK, Mohapatra PK, Sehgal R, et al. Genetic diversity and antibody responses against *Plasmodium falciparum* vaccine candidate genes from Chhattisgarh, Central India: Implication for vaccine development. *PLoS One*. 2017; 12(8):e0182674. Epub 2017/08/07. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182674> PMID: 28787005; PubMed Central PMCID: PMC5546615.
63. Khosravi A, Hommel M, Sayemiri K. Age-dependent antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP-2). *Parasite Immunol*. 2011; 33(3):145–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01260.x> PMID: 21306398.
64. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1):13–36, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08> PMID: 19136431; PubMed Central PMCID: PMC2620631.
65. Vicentin EC, Franoso KS, Rocha MV, Iourtov D, Dos Santos FL, Kubrusly FS, et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect Immun*. 2014; 82(3):1296–307. Epub 2013/12/30. <https://doi.org/10.1128/IAI.01169-13> PMID: 24379279; PubMed Central PMCID: PMC3958008.
66. Obaldia N, Stockelman MG, Otero W, Cockrill JA, Ganeshan H, Abot EN, et al. A *Plasmodium vivax* Plasmid DNA- and Adenovirus-Vectored Malaria Vaccine Encoding Blood-Stage Antigens AMA1 and MSP1. *Clin Vaccine Immunol*. 2017; 24(4). Epub 2017/04/05. <https://doi.org/10.1128/CVI.00539-16> PMID: 28179404; PubMed Central PMCID: PMC5382831.
67. Bouillet L, Dias MO, Dorigo NA, Moura AD, Russell B, Nosten F, et al. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. *Infect Immun*. 2011; 79(9):3642–52. Epub 2011/07/05. <https://doi.org/10.1128/IAI.05048-11> PMID: 21730090; PubMed Central PMCID: PMC3165491.

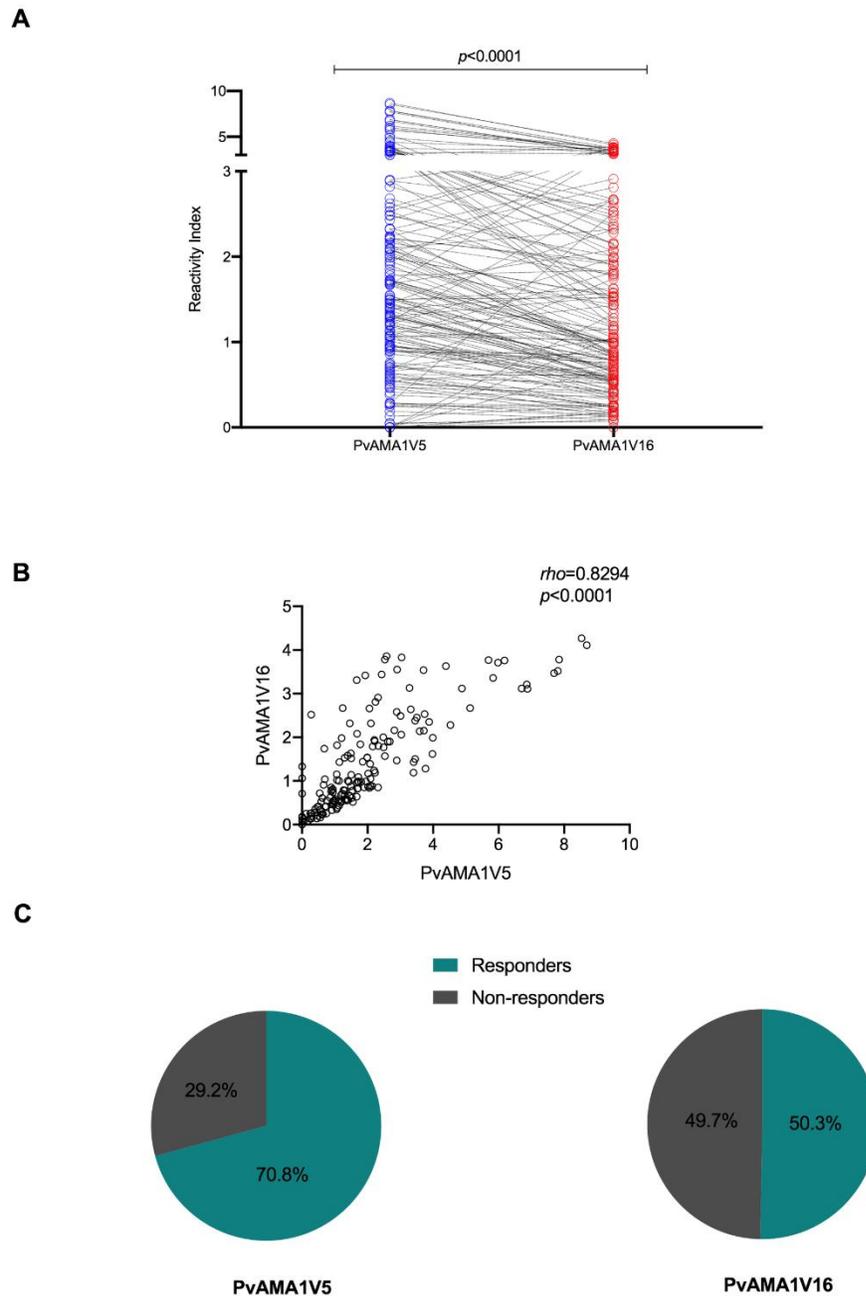
Supporting information



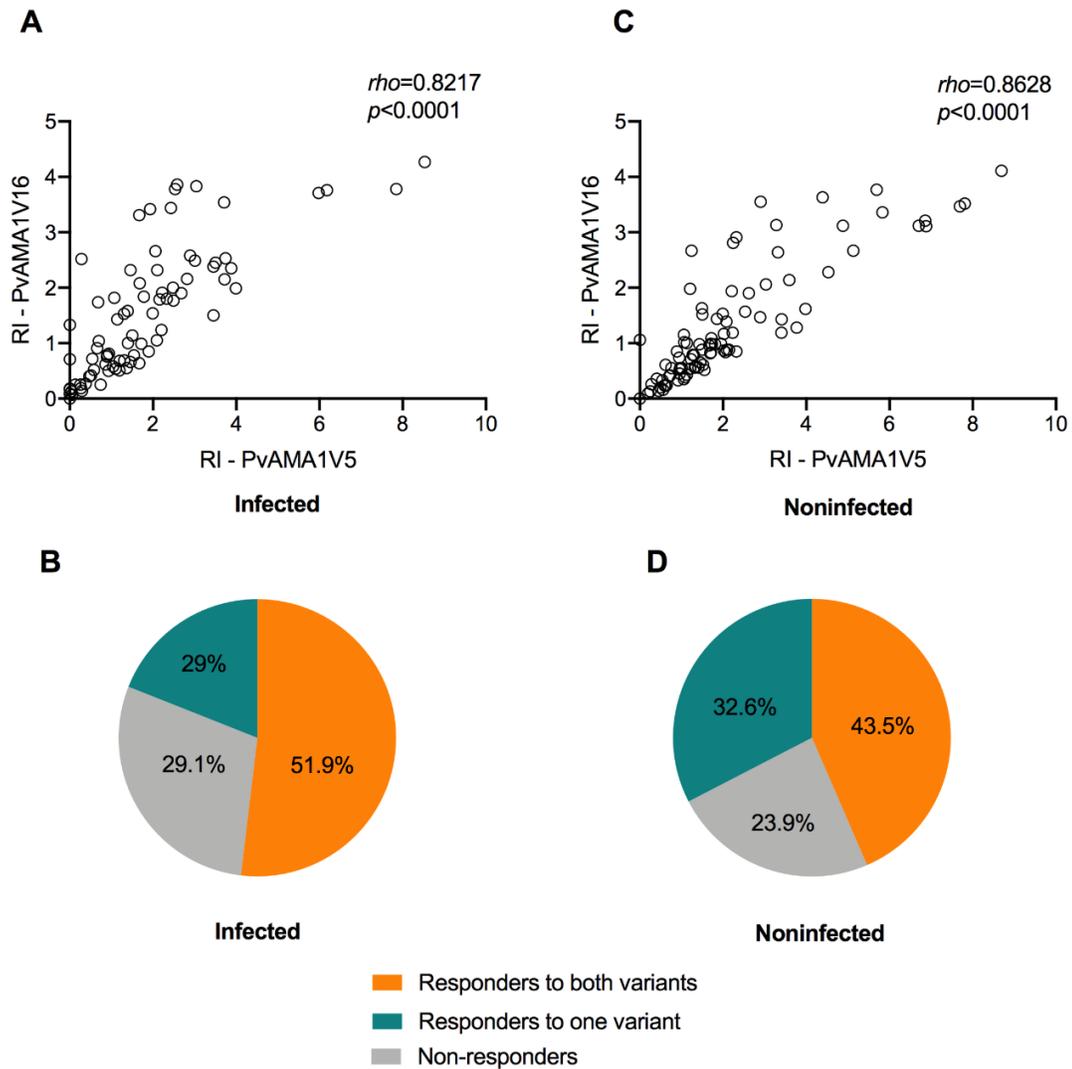
S1 Fig. Dendrogram of phylogenetic relationships between haplotypes of *pvama1* in Manaus.



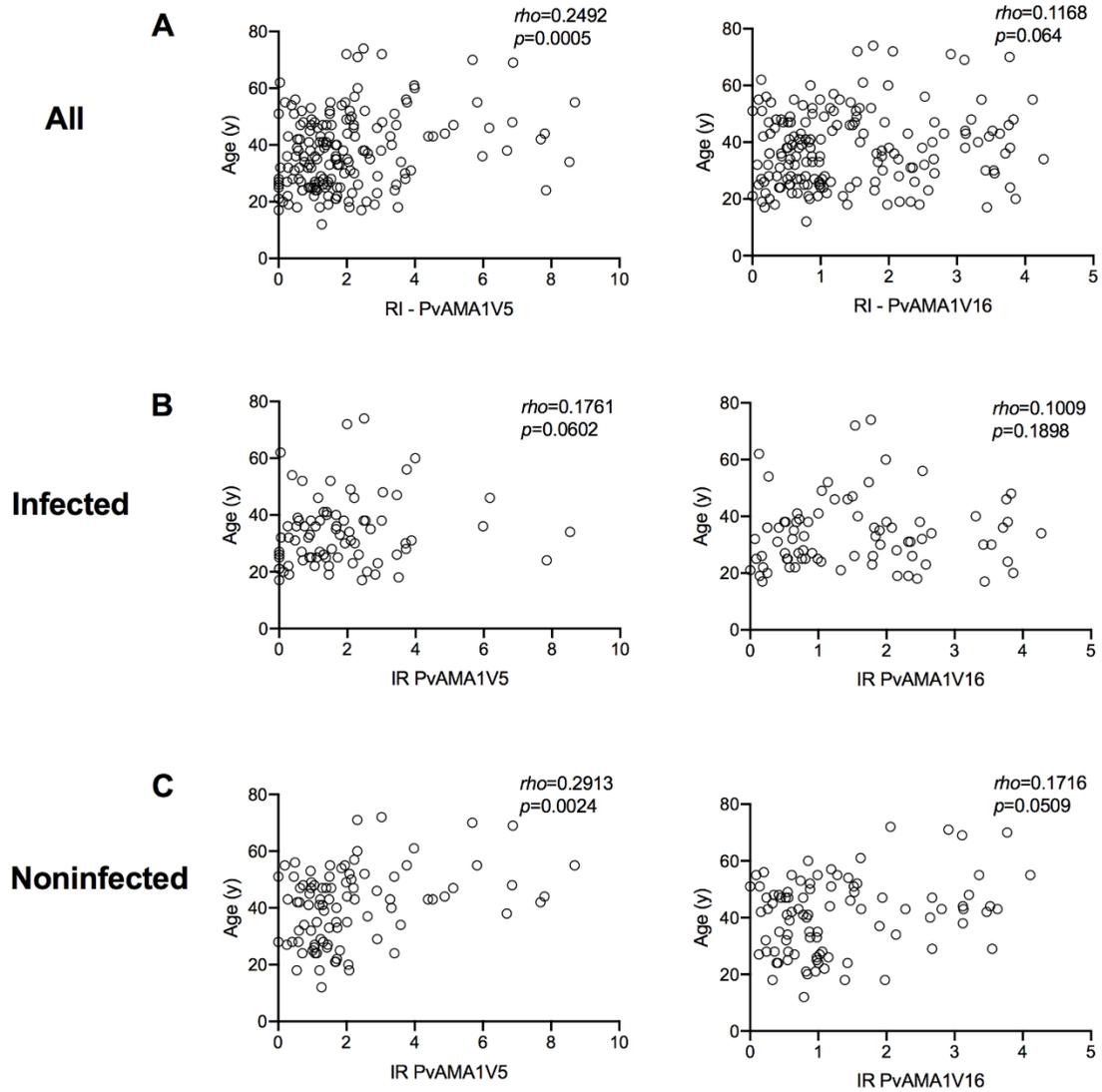
S2 Fig. Characterization of recombinant proteins PvAMA1V5 and PvAMA1V16. A) SDS-PAGE analysis of ~77kDa rPvAMA1V5 and PvAMAV16 stained with Coomassie Brilliant Blue. B) Circular Dichroism spectra of PvAMA1 variants. Dotted line (PvAMA1V16) and solid line (PvAMA1V5). MM: Molecular marker PageRuler Prestained Protein Ladder, 10- 180kDa (Thermo Scientific).



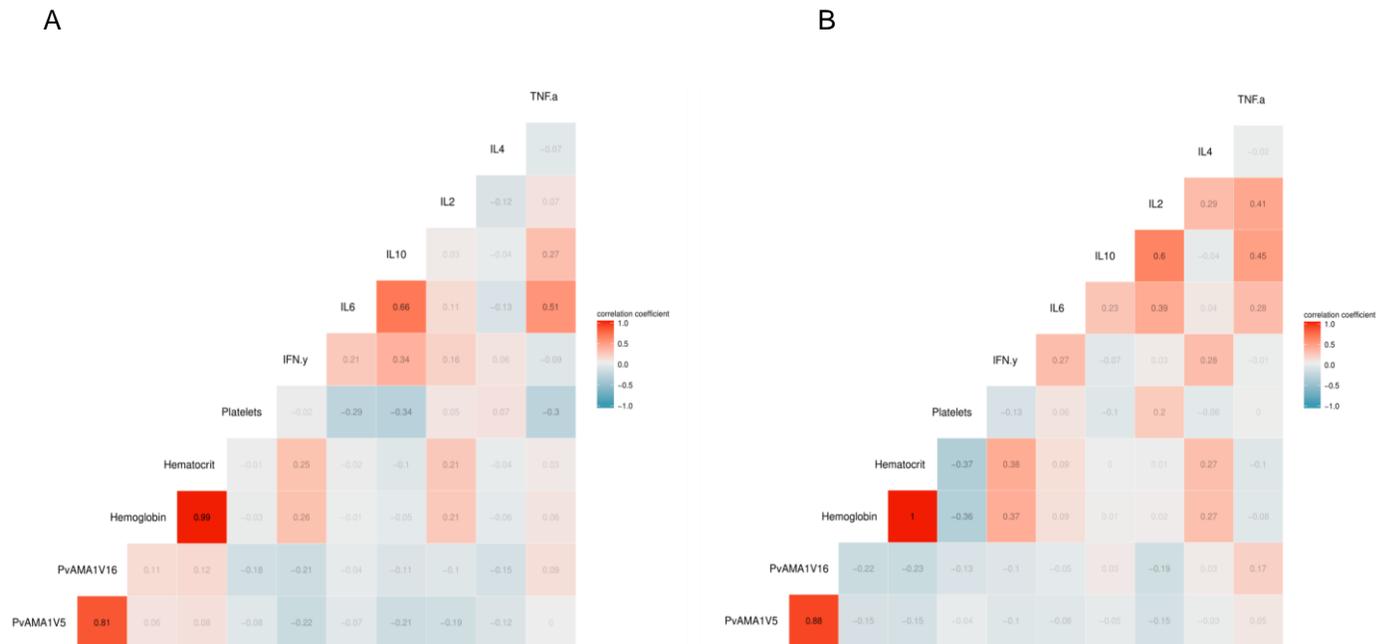
S3 Fig. Correlation and paired comparison of naturally acquired immune responses to PvAMA1 variants from the Itaituba population. A) Paired PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG responses comparison (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.0001$, $n = 171$). B) Spearman correlation coefficient (ρ) of IgG antibodies against each PvAMA1 variant and t-test p-value (p). C) Prevalence of responders and non-responders towards PvAMA1V5 and PvAMA1V16.



S4 Fig. Correlation between immune responses to PvAMA1 haplotypes in distinct groups from Itaituba. A) Spearman correlation coefficient (ρ) between PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG antibodies and t-test p-value (p) against each variant in acutely infected individuals. B) Prevalence of immune response towards PvAMA1 variants in infected individuals, C) ρ between PvAMA1V5 and PvAMA1V16 IgG antibodies and t-test p-value (p) in noninfected individuals. D) Prevalence of immune response towards PvAMA1 variants in noninfected individuals.



S5 Fig. Correlation between age and antibody response towards to PvAMA1 variants. A) Spearman Correlation coefficient (ρ) between PvAMA1 variants reactivity indexes and age from full Itaituba sample. B) ρ between PvAMA1 variants reactivity indexes and age for infected individuals, C) ρ between PvAMA1 variants reactivity indexes and age for noninfected individuals. T-test p-value (p).



S6 Fig. Multivariate correlation coefficient in infected and noninfected individuals from Itaituba. A) Correlation matrix of the infected group. B) Correlation matrix of the noninfected group. Positive correlations are represented with red, and negative correlations are represented with blue squares. Pearson correlation was applied to verify associations between the PvAMA1 variant reactivity index and hemoglobin, hematocrit, platelets and plasmatic cytokines (IFN- γ , IL6, IL10, IL2, IL4, TNF- α). $p < 0.05$ was considered significant. r values are indicated in the figure.

S1 Table. Predicted linear B-cell epitopes and mutation sites based on the PvAMA1 reference sequence comparing PvAMA1 haplotypes. Amino acids colored red indicate polymorphisms.

Amino acid position	B-cell epitope
25-40	QKPSRLTRSANNVLE
43-59	PTVERSTRMSNPWKAFM
63-83	DIERTHSSGVRVDLGEDAEVE
102-108	VIENSDV
117-121	GDQKL
130-136	NANDHIS
149-158	DNVEMMKLND
161-179	LCRTHAASFVMAGDQNSSY
189-216	EKTCHMLYLSAQENMGPRYCSPDAQNRD
236-265	SKNVRNDWDKKCPRKNLGNAKFGLWVDGNC
287-304	FGASASDQPTQYEEEMTD
331-339	NSDNFKSKG
344-350	WANFDSV
362-381	TCLINDKNFIATTALSHPQE
401-413	KQSRNMNLYSVDG
424-431	SNDKESIK
435-447	EPERISNSTCNFY
457-464	EIKENNQV
477-488	GEEKSNKQMLLI
512-521	NNDKYDKMDQ
531-535	RKDEM
545-558	EDKRASHTTPVLME

CAPÍTULO 2

**Avaliação da longevidade da resposta de anticorpos na malária causada
por *Plasmodium vivax***

1. INTRODUÇÃO

As células B de memória assumem um papel primordial na memória imunológica contra patógenos, provocando a resposta imune após exposição subsequente ao antígeno. A primeira evidência direta de que anticorpos poderiam conferir imunidade à malária foi em 1960, no estudo que demonstrou a eficácia da transferência passiva de anticorpos na redução da carga parasitária em crianças infectadas (COHEN; MCGREGOR; CARRINGTON, 1961). Além disso, atualmente temos evidências sobre o desenvolvimento da imunidade clínica contra as malárias falciparum e vivax em regiões endêmicas após sucessivas infecções, vista através dos casos de malária assintomáticos (SCHOFIELD; MUELLER, 2006; TRAN; LI; DOUMBO; DOUMTABE *et al.*, 2013).

Apesar da capacidade de indução de uma resposta de anticorpos, são necessárias infecções sucessivas para que haja a manutenção dos níveis de anticorpos, provavelmente devido à imaturidade imunológica do hospedeiro e à variação antigênica dos parasitas circulantes o que evidencia que a indução de células B de memória não é tão eficiente (LANGHORNE; NDUNGU; SPONAAS; MARSH, 2008; SULLIVAN; SSEWANYANA; WAMALA; NANKYA *et al.*, 2016). No entanto, estudos têm demonstrado que crianças e adultos desenvolvem células B de memória contra o *Plasmodium falciparum* capazes de persistir por anos, mesmo na ausência de reinfecções (NDUNGU; LUNDBLOM; RONO; ILLINGWORTH *et al.*, 2013; WIPASA; SUPHAVILAI; OKELL; COOK *et al.*, 2010). Assim, é evidente a necessidade de estudos que busquem entender o desenvolvimento e a persistência de memória imunológica na busca por um candidato vacinal.

A busca por novos candidatos vacinais contra a malária vivax é restrita devido às especificidades do parasito, principalmente a dificuldade em manter o parasito em cultura, o que ressalta a importância de metodologias alternativas que auxiliem na busca de novos alvos. Neste segundo capítulo, serão avaliados e selecionados, a partir de análises *in silico*, potenciais candidatos vacinais e será avaliada a presença de anticorpos naturalmente adquiridos e a longevidade das respostas de anticorpos, em indivíduos expostos à malária vivax, contra as duas variantes de PvAMA1 e os novos potenciais candidatos vacinais selecionados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras de pacientes com malária vivax

4.1.1 Área e população de estudo

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 84250218.4.0000.0005) (Anexo III). Todos os voluntários que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo IV) e responderam a um questionário (Anexo V). Todos os indivíduos foram informados sobre os objetivos do estudo, de maneira acessível. Após assinarem o consentimento, um número de identificação foi atribuído a cada participante.

Entre maio de 2018 e janeiro de 2019 foram coletadas amostras de sangue de indivíduos sintomáticos diagnosticados com malária vivax no Hospital da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), situado em Manaus - AM. Além dos pacientes com malária, indivíduos não infectados, residentes em Manaus (região endêmica de malária) e em Campinas – SP (região não endêmica) foram convidados a participar do estudo, como controles negativos de área endêmica (CNE) e não endêmica (CNNE), respectivamente.

O critério de inclusão no estudo foi ter diagnóstico positivo para a malária vivax, enquanto os critérios de exclusão foram: indivíduos menores de 18 anos e acima de 68 anos, diagnóstico de malária há menos de seis meses, indivíduos portadores de doenças autoimunes, imunossuprimidos e gestantes.

As amostras de sangue foram coletadas após o diagnóstico de malária vivax pelo método de gota espessa. A primeira coleta foi considerada o dia 0 (D0). Os pacientes foram convidados a comparecer novamente ao hospital em aproximadamente 50 dias e 180 dias após a primeira coleta (D50 e D180 respectivamente). Alguns pacientes não puderam retornar ao hospital, sendo assim, a coleta se deu por busca ativa domiciliar. Em cada dia foram coletados aproximadamente 80 mL de sangue periférico de cada indivíduo. A coleta foi realizada em tubos de coleta a vácuo contendo heparina.

Devido ao não comparecimento dos indivíduos ao hospital nas datas estipuladas houve uma variação nas datas de coletas dos dias D50 e D180. A média de dias em D50 foi 50 com o limite inferior de 40 e limite superior de 67 dias e em D180 a média foi 180 com limite inferior de 152 e limite superior de 206 dias.

No ano de 2018, período em que ocorreu a maior parte das coletas, foram notificados 187.757 casos autóctones de malária no Brasil, dos quais, 73.512 ocorreram na região amazônica. Em 2018, aproximadamente 87,7% dos casos autóctones de malária no Brasil foram por *P. vivax*. Apenas 12,3% dos casos foram por *P. falciparum* ou malária mista (mais de uma espécie).

A Incidência Parasitária Anual (IPA) é utilizada como o indicador de risco para infecção por malária no Brasil. Em 2019, o IPA foi classificado em quatro categorias: municípios de muito baixo risco (IPA < 1 caso/1.000 habitantes), baixo risco (IPA entre 1 e 10 casos/1.000 habitantes), médio risco (IPA entre 10 e 50 casos/1.000 habitantes) e alto risco (IPA ≥ 50 casos/1.000 habitantes.). O IPA expressa o número de exames positivos, no local provável de infecção, dividido pela estimativa do tamanho da população neste município, no ano de análise e padronizado para a taxa de 1.000 habitantes.

No presente estudo, 98,8% dos participantes declararam-se residentes em Manaus, Amazonas, município classificado como de baixo risco de transmissão (10 > IPA ≥ 1). No entanto, a maioria dos indivíduos informou que o local provável onde ocorreu a infecção situa-se fora da cidade de Manaus, principalmente em regiões rurais como sítios e reservas indígenas situadas nos municípios de Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, regiões de médio risco, e São Gabriel da Cachoeira, região de alto risco (MS, 2020a).

4.2 Diagnóstico da infecção por *Plasmodium vivax* e tratamento

A infecção por *P. vivax* foi confirmada quando houve detecção de parasitos tanto por microscopia quanto por PCR quantitativa (qPCR). O diagnóstico por microscopia foi realizado por profissionais do Hospital da Fundação de Medicina Tropical

Dr. Heitor Vieira Dourado a partir das análises de lâminas pelo método de gota espessa. Para a realização do diagnóstico molecular por qPCR, primeiramente foi realizada a extração de DNA genômico total a partir de 200µL de sangue total periférico utilizando o kit QIAamp DNA blood kits (Qiagen, Hilden, Germany), conforme as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C.

Na reação de qPCR foram utilizadas sequências de oligonucleotídeos conforme descrito na literatura (ROSANAS-URGELL; MUELLER; BETUELA; BARNADAS *et al.*, 2010). A reação foi padronizada para detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*. As condições da qPCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por amplificação com 30 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, com aquisição de fluorescência ao final de cada etapa de extensão.

Todas as reações foram realizadas na presença de controles positivos e negativos e em triplicatas. Como controles negativos foram utilizados todos os reagentes exceto o DNA, que foi substituído por água ultrapura. Como controles positivos foram utilizados DNA de *P. falciparum* extraído da cepa 3D7 e DNA de indivíduos infectados por *P. vivax* previamente diagnosticados por microscopia e *Nested-PCR* (SNOUNOU; SINGH, 2002).

4.3 Processamento das amostras

Após cada coleta de sangue (D0, D50, D180) foi realizado um hemograma utilizando o analisador automático de hematologia Sysmex KX21N (Sysmex Corporation-Roche, Japan). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 900 x g, por 10 min, a temperatura ambiente. Aproximadamente 30 mL de plasma de cada paciente foi coletado e armazenado em tubos cônicos de 15 mL em biofreezer a -80°C. Ademais, foram realizados esfregaços sanguíneos no D0, uma lâmina foi corada com panótico rápido, para registro da parasitemia, e três foram armazenadas sem coloração. Por fim, todos os pacientes foram caracterizados quanto a tipagem sanguínea com a utilização do kit de reagentes para classificação do sistema sanguíneo ABO (Prothemo).

4.4 Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

O sangue foi centrifugado a 900 x g por 10 min e o plasma foi coletado, como descrito anteriormente. Imediatamente o *buffy coat* (fração que contém a maior parte dos glóbulos brancos e plaquetas do sangue) foi coletado e diluído com o mesmo volume de PBS 1X (1:1) (Sigma Aldrich, USA) esta diluição do *buffy coat* foi dispensada cuidadosamente sobre o Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Reino Unido) na proporção de 2:1 (Sangue:Ficoll). Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 500 x g, 20 °C por 30min sem desaceleração a fim de separar as PBMCs por gradiente de densidade. Após centrifugação visualizou-se a “nuvem” de PMBC. As PBMC foram coletadas e submetidas a duas lavagens com PBS 1x. Em seguida, as células foram contadas na câmara de Neubauer e congeladas em solução de soro fetal bovino 90 % e DMSO 10 %. Alíquotas de 1 mL contendo 1 a 9×10^6 células de células foram congeladas em freezer a -80 °C utilizando o recipiente para congelamento Mr. Frosty (Nalgene) e 48h depois foram realocadas em um tambor de nitrogênio líquido.

4.5 Caracterização fenotípica das células B por citometria de fluxo

A caracterização imunofenotípica das subpopulações de linfócitos B circulantes no sangue periférico foi realizada conforme metodologia descrita por Illingworth e colaboradores (ILLINGWORTH; BUTLER; ROETYNCK; MWACHARO *et al.*, 2013). Esta caracterização foi realizada a partir de células B circulantes, isoladas do sangue periférico de indivíduos com infecção por malária vivax (D0) ou em convalescença (D50 e D180) e não infectados residentes de região endêmica (CNE).

As PBMC foram descongeladas, transferidas para placas de 96 poços com fundo “U” e centrifugadas a 3000 x g, a 4°C por 3 min. O *pellet* de células foi ressuspenso em solução de bloqueio (PBS 1x e 5% de SFB) seguido de incubação por 1h, 4°C para bloqueio das porções Fc. As células foram novamente centrifugadas e ressuspenso em solução de bloqueio contendo anticorpos marcadores de superfície anti-CD3 FITC, anti-CD19 PE-Cy7, anti-CD20 APC-Cy7, anti-CD21 APC, anti-CD27 PE,

anti-CD10 PerCP-Cy5.5 (BD Bioscience) (Tabela 2) e concomitantemente foram marcadas com AnnexinV-PI para avaliação da viabilidade celular. Após marcação, foram realizadas três lavagens com PBS 1x e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS 1x. A compensação de cores foi realizada utilizando Beads (BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control). Foram utilizados os controles sem marcação, com marcação simples (marcação com cada um dos fluorocromos) e controles isotípicos. A aquisição das amostras e beads foi realizada no citômetro de fluxo FACScanto II (Becton Dickinson Biosciences).

As populações de células B foram classificadas da seguinte forma: B totais, imaturas, naives, MBC clássicas, MBC atípicas, ABC ativadas e plasmócitos, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos subtipos de células B de acordo com o padrão de marcadores de superfície e fluorocromos específicos de cada anti-CD.

Subtipos de Células B	Marcadores de superfície	Fluorocromo
B totais	CD19 ⁺	PECy7
B Imaturas	CD19 ⁺ , CD10 ⁺	PECy7, PerCP-Cy5.5
B Naives	CD19 ⁺ , CD10 ⁻ , CD21 ⁺ , CD27 ⁻	PECy7, PerCP-Cy5.5, APC, PE
MBC Clássicas	CD19 ⁺ , CD10 ⁻ , CD21 ⁺ , CD27 ⁺	PECy7, PerCP-Cy5.5, APC, PE
MBC Atípicas	CD19 ⁺ , CD10 ⁻ , CD21 ⁻ , CD27 ⁻	PECy7, PerCP-Cy5.5, APC, PE
MBC Ativadas	CD19 ⁺ , CD10 ⁻ , CD21 ⁻ , CD27 ⁺ , CD20 ⁺	PECy7, PerCP-Cy5.5, APC, PE, APC-Cy7
Plasmócitos	CD19 ⁺ , CD10 ⁻ , CD21 ⁻ , CD27 ⁺ , CD20 ⁻	PECy7, PerCP-Cy5.5, APC, PE, APC-Cy7

As três amostras (D0, D50, D180) de cada indivíduo foram analisadas no mesmo dia, a fim de evitar possíveis variações experimentais. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo_V10 seguindo o esquema que consta na Figura 5.

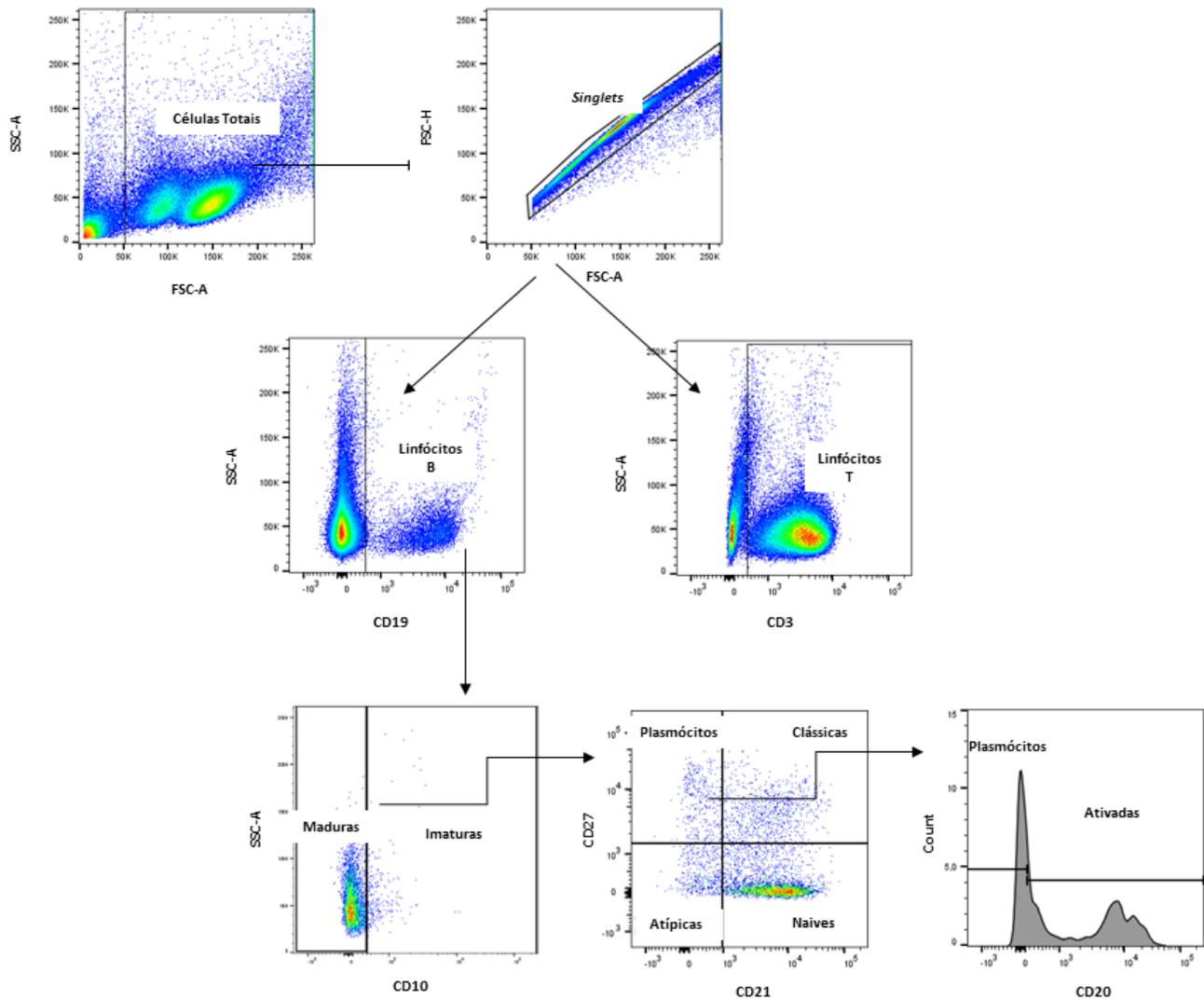


Figura 5. Estratégia de *gates* para a caracterização fenotípica das células B por citometria de fluxo. Os linfócitos T foram identificados pela expressão de CD3 e as células B totais pela expressão de CD19. Em seguida, os subtipos de células B foram identificados pela expressão de CD10, CD20, CD21 e CD27. Os gráficos de pontos mostram exemplos representativos da distribuição de células em cada *gate* e como foram realizadas as classificações em cada grupo.

4.6 Resposta imune humoral contra as variantes PvAMA1V5 e PvAMA1V16 durante a fase aguda (D0) e convalescença (D50 e D180)

A investigação de anticorpos IgG e IgM naturalmente adquiridos contra os antígenos PvAMA1V5, PvAMA1V16 foi feita por ELISA. No total foram testados 30 plasmas do D0, 30 plasmas do D50 e 12 plasmas do D180.

Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5 µg/µl de proteína por poço. Após incubação *overnight* a 4°C, as placas foram bloqueadas com solução de 5% de leite desnatado em PBS-Tween 0,05% por 2 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e incubadas com os plasmas na diluição 1:100. Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, outra lavagem com PBS-T foi realizada. Imediatamente foi adicionado anticorpo anti-IgG ou anti-IgM humano conjugado à peroxidase na diluição 1:2000 (Sigma). Após lavagens com PBS-T, a quantificação dos anticorpos aderidos foi medida por aplicação de revelação contendo o substrato enzimático contendo OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*), 0,03% H₂O₂, e tampão fosfato-citrato. Em seguida, foi feita uma incubação na ausência de luz, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Por fim, foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) a 490 nm. Os valores das D.O. foram normalizados com os valores obtidos nos poços controle contendo anticorpo anti-GST, contidos em todas as placas. Os valores de *cut off* foram determinados a partir da média das absorbâncias de 18 plasmas negativos (indivíduos de região não endêmica), mais três desvios padrão. Os índices de reatividade (IR) foram obtidos pela D.O. da amostra dividido pelo valor do *cut off*. Foram considerados positivos os plasmas que apresentaram $IR \geq 1$.

4.7 Seleção de potenciais antígenos vacinais de *P. vivax* através de análises *in silico*

O número de antígenos que vêm sendo estudados para compor uma formulação vacinal contra a malária vivax é limitado. PvAMA1 é um dos candidatos mais promissores conhecidos até o momento, porém, é evidente a necessidade de mais estudos incluindo outros alvos em potencial. Neste trabalho, além das variantes PvAMA1 V5 e PvAMA1 V16, foram selecionados cinco candidatos através de análises *in silico*, objetivando selecionar antígenos desconhecidos ou pouco explorados.

Uma estratégia de imunoinformática conhecida como vacinologia reversa utiliza da predição *in silico* de candidatos a uma vacina proteica a partir de sequências genômicas, a fim de selecionar candidatos vacinais (BAHRAMI; PAYANDEH; KHALILI; ZAKERI *et al.*, 2019). Esta é uma ferramenta para superar algumas limitações dos métodos convencionais de *screening* de candidatos vacinais (DEL TORDELLO ; DELANY 2017). O conceito básico de vacinologia reversa foi proposto no ano de 2000 com a identificação de novos candidatos à vacina meningocócica a partir da sequência do genoma de uma cepa de *Neisseria meningitidis* (PIZZA; SCARLATO; MASIGNANI; GIULIANI *et al.*, 2000). Este trabalho levou ao licenciamento da vacina MenB (Bexsero), estabelecendo a vacinologia reversa como uma estratégia de ponta para o desenvolvimento rápido de vacinas.

Atualmente existem diversos programas de predição acurados nos quais diversas abordagens podem ser adotadas para selecionar genes ou proteínas com certas características. Neste trabalho, uma sequência de análises foi utilizada para triar antígenos de *Plasmodium vivax*, a partir da sequência genômica da cepa *P. vivax* Salvador-1 (Sal-1), depositada no PlasmoDB (Figura 6), principalmente baseadas na predição de antigenicidade e de epítomos de células B. Para a predição de antigenicidade foi utilizado o software VaxiJen 2.0 (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007) enquanto para a predição de epítomos de células B foi utilizado o Bepipred 2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor (JESPERSEN; PETERS; NIELSEN; MARCATILI, 2017).

Foram incluídas na análise sequências gênicas que codificam proteínas com funções desconhecidas, hipotéticas e putativas. Para isso, foi realizada uma pré-seleção utilizando *script* em Perl baseada na nomenclatura presente na anotação de cada sequência. Foram excluídas sequências da superfamília *pir*, incluindo os antígenos *vir*, por serem altamente polimórficos, o que dificulta a geração de resposta imune específica. Também foram excluídas sequências codificadoras de proteínas intracelulares (Anexo 1, Tabela 5).

As sequências que passaram por este filtro inicial foram avaliadas quanto ao *score* de antigenicidade. Para isso, foi feito um *upload* manual das sequências de aminoácidos no software VaxiJen 2.0, que classifica os antígenos com base nas propriedades fisicoquímicas das proteínas, gerando um *score*. O *threshold* padrão, determinado pelo software, para sequências de parasitos é $\geq 0,5$, porém, para selecionar candidatos potencialmente mais antigênicos, foram selecionadas todas as sequências que obtiveram um *score* ≥ 1 . Em seguida as sequências antigênicas foram submetidas a predição do número de epítomos de células B, utilizando *script* em Perl que acessa o sistema do Linux para utilizar o programa Bepipred 2.0: *Sequential B-Cell Epitope Predictor API*. O Bepipred analisa e seleciona proteínas que atendem aos seguintes parâmetros: *threshold* = 0.62 (95-99% especificidade e 95% de sensibilidade), *window size*=9 e epítomos contendo no mínimo 5 e no máximo 41 resíduos de aminoácidos. A partir desta triagem, foram selecionadas apenas sequências com mais de quatro epítomos de células B.

Por fim, foi realizada uma análise com base nos dados de cada sequência contidos no PlasmoDB. Foram selecionadas apenas sequências com taxa de mutação menor que 6, pico de transcrição após 20h, resultando em cinco potenciais candidatos vacinais. Esses candidatos foram caracterizados quanto ao seu peso molecular, número de aminoácidos, presença de peptídeo sinal, presença de íntrons, domínios transmembrana, presença de ortólogos em outras espécies de *Plasmodium*.

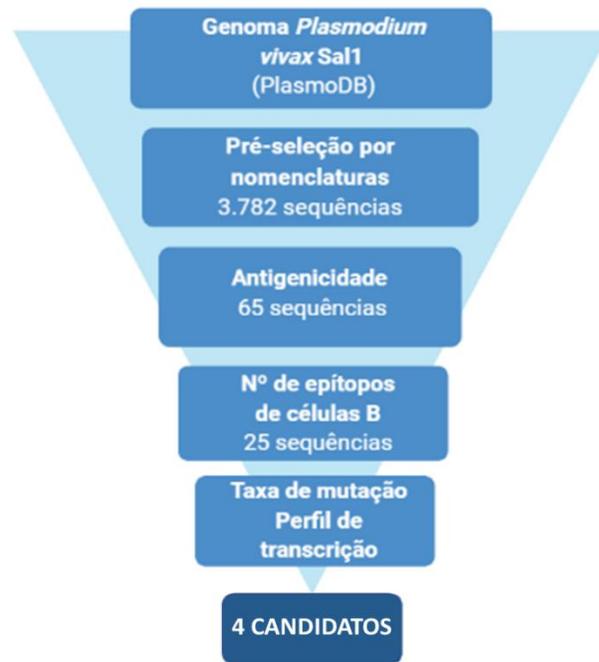


Figura 6. Sequência de análises utilizadas na seleção dos candidatos vacinais.

4.8 Expressão das proteínas recombinantes em sistema heterólogo eucarioto

As proteínas de *Plasmodium* spp. são difíceis de serem expressas devido à alta frequência de códons raros em seus genes. Diferentes organismos procaríotos e eucariotos são utilizados para expressão destas proteínas, como *Escherichia coli* (BITTENCOURT; LEITE; SILVA; PIMENTA *et al.*, 2018; OLIVEIRA-FERREIRA; VARGAS-SERRATO; BARNWELL; MORENO *et al.*, 2004); baculovírus (PANG; HASHIMOTO; TAM; MENG *et al.*, 2002), leveduras (MILES; ZHANG; SAUL; STOWERS, 2002; VICENTIN; FRANÇOSO; ROCHA; IOURTOV *et al.*, 2014); tabaco (TURPEN; REINL; CHAROENVIT; HOFFMAN *et al.*, 1995) e células de mamíferos (HOSTETLER; SHARMA; BARTHOLDSON; WRIGHT *et al.*, 2015; RAMASAMY; YASAWARDENA; KANAGARATNAM; BURATTI *et al.*, 1999).

O sistema de expressão mais utilizado é o bacteriano, uma vez que é capaz de produzir grande quantidade de proteína em menos tempo além de ser um método de baixo custo e que não necessita de equipamentos muito sofisticados, porém, as proteínas

recombinantes frequentemente são expressas de forma truncada ou insolúvel, dentro de corpos de inclusão nas bactérias, necessitando uma padronização prolongada e laboriosa.

Visando uma expressão de proteínas mais rápida, optou-se por utilizar o sistema de expressão em células eucariotas. Os genes que codificam cada uma das proteínas foram sintetizados e otimizados para a expressão em células de mamífero pela empresa GenScript (Nova Jersey-EUA). Quatro genes inteiros foram sintetizados e um fragmento de gene (PVX_009) foram sintetizados. Optou-se pela síntese de um fragmento de PVX_009 devido ao seu alto peso molecular, que dificultaria a expressão da proteína recombinante. A seleção do fragmento se deu através de uma análise de antigenicidade do gene inteiro utilizando o software VaxiJen 2.0, que selecionou uma região com maior score de antigenicidade.

Os genes foram clonados no plasmídeo pMA-T com exceção do fragmento do gene PVX_009 que foi inserido em pMK-RQ. Os plasmídeos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapura estéril e estocados a uma concentração final de 100 ng/μL. Em seguida, foi realizada a transformação de bactérias *E.coli* TOP10 competentes por choque térmico. Para isso, 0,5 μL de cada plasmídeo foi adicionado a uma suspensão de 50 μL de bactérias que foram incubadas no gelo durante 30 min. Para a realização do choque térmico, o tubo foi transferido rapidamente para o bloco térmico, a 42 °C onde permaneceu por 1 min e, em seguida, foi novamente transferido para o gelo, onde permaneceu por 2 min. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de meio LB (*Luria-Bertani medium*) ao tubo seguido de incubação a 37° C por 1h. Após o período de incubação, foi realizada uma centrifugação a 3000 x g durante 5min e o *pellet* foi ressuspensado em 100 μL de meio LB. O volume total de suspensão foi semeado em uma placa de meio LB sólido com antibiótico Ampicilina para selecionar bactérias contendo as transformações em plasmídeos pMA-T e meio LB acrescido de kanamicina para selecionar bactérias transformadas com o plasmídeo pMK-RQ, conforme gene de resistência de cada vetor.

Uma unidade formadora de colônia foi inoculada em 4 mL de meio LB líquido e incubada *overnight*, a 37 °C, sob agitação (2000 RPM). No dia seguinte foi realizada a

mini-preparação plasmidial para purificação dos plasmídeos utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

Os plasmídeos purificados foram clonados no vetor pEGFP-N1 (Anexo 2). Para isso, foi realizada uma etapa de digestão do vetor pEGFP-N1 com as enzimas Apal e Eco-RI seguido de incubação *overnight*, a 37°C. Em seguida, foi realizada uma corrida em gel de agarose para análise do padrão de bandas e confirmação da digestão. Os insertos foram ligados aos plasmídeos em uma reação de ligação contendo 3,4 µL do inserto, 1,7 µL do vetor, 0,5 µL T4 DNA ligase e 1,4 µL de 5X tampão ligase.

A expressão das proteínas recombinantes foi realizada no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz-PR).

4.8.1 Cultivo e transfecção das células CHO-745, HeLa e HEK-293T

Células CHO-745, HeLa e HEK-293T foram descongeladas e mantidas em cultivo em meio RPMI 1640 com 10% SFB e 1% de penicilina e estreptomicina, a 37°C e 5% CO₂ durante duas passagens. Quando atingiram 70% de confluência as células foram plaqueadas em placas de 6 poços (2,5 x 10⁵ células por poço) e incubadas nas mesmas condições de cultivo durante três dias.

A transfecção celular foi realizada utilizando o kit *Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, antes da transfecção o meio de cultura foi substituído por RPMI 1640 acrescido de 2% SFB sem antibióticos. Em seguida, foi adicionado 1,5 µL de lipofectamina em 50 µL de meio Opti-MEM™ *Reduced Serum Medium* (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, 2 µL do reagente P3000 e cada plasmídeo (0,5 ng/poço) foram diluídos em meio Opti-MEM separadamente. As soluções foram misturadas em uma proporção de 1:1 (v/v) e incubadas à temperatura ambiente por 20 min. O complexo de Lipofectamina e DNA foi adicionado lentamente (50µL/poço) sobre as células. As células foram novamente incubadas a 37°C, 5% CO₂ por até 22 h. Após este período o meio das células foi substituído por RPMI 1640, 10% de SFB, sem antibiótico e incubado

por mais 24 h. A eficiência da transfecção foi avaliada após análise em microscópio óptico invertido de fluorescência (Leica, DMI6000B).

4.9 Análise de reações inespecíficas entre as células e os plasmas

A escolha da linhagem celular para utilização nos ensaios de imunorreatividade deve ser feita considerando que podem ocorrer ligações inespecíficas entre as células e os anticorpos presentes no plasma humano, que geram falsos resultados positivos. Desta forma, foi realizado um teste com células das três linhagens: HEK-293T, HeLa e CHO-745 a fim de determinar a melhor linhagem celular para utilização nos testes de imunorreatividade. Para isso, as células foram incubadas com plasma humano sob duas condições: 1) plasma de indivíduo sem malária 2) *pool* de plasmas de indivíduos infectados com malária, ambos diluídos 1:50. Posteriormente foram realizadas três lavagens com PBS 1x e adicionado anticorpo anti-IgG humano conjugado com Alexa Fluor-594 (1:200) seguido de uma incubação a 4°C por 45 min. As células foram lavadas novamente 3x com PBS 1x e analisadas por citometria de fluxo utilizando o citômetro FACS Calibur 4C (Becton Dickinson).

4.10 Detecção de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra os antígenos de *P. vivax*

A antigenicidade de cada proteína foi avaliada através da detecção de reatividade entre os plasmas e as células HEK-293T expressando as proteínas de *P. vivax*. Para isso, as células cultivadas em garrafas de cultivo de 75 cm² foram transfectadas com cada um dos genes de *P. vivax*. Dois dias após a transfecção, foi feita a contagem celular e estas foram repicadas em placas de 96 poços com fundo em “U”. As células foram incubadas com solução de bloqueio (PBS 1x com 5% de SFB) durante 1 h a 4°C. Após incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. As amostras de plasma de indivíduos expostos à malária vivax (D0, D50 e D180) e não expostos (controles negativos não endêmicos) foram adicionados individualmente em

cada poço, diluídos em solução de bloqueio (1:50) e as placas foram incubadas a 4°C por 1 h. Após este período, foram realizadas três lavagens com PBS 1x seguido se incubação com anticorpo anti-IgG humano conjugado com Alexa-fluor 633 (1:500) e mais uma vez incubado a 4°C, durante 30 min, ao abrigo da luz. Por fim, a reatividade de anticorpos IgG específicos contra cada uma das proteínas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo FACScanto II (Becton Dickinson Biosciences). Os valores de *cut off* foram determinados a partir da média das absorbâncias dos plasmas negativos mais três desvios padrão. Os índices de reatividade foram obtidos pela D.O. da amostra dividido pelo valor do *cut off*. Foram considerados positivos os plasmas que apresentaram $IR \geq 1$.

4.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Inc., EUA).

Quando dois grupos amostrais, com distribuição normal, foram avaliados em análise pareadas, utilizou-se teste t, enquanto dados com distribuição anormal foram analisados pelo teste de Wilcoxon. Nas análises de dados não pareados utilizou-se teste t e Mann-Whitney em grupos de dados com distribuição normal e anormal respectivamente. Nas análises pareadas entre mais de dois grupos de dados com distribuição normal, foi utilizado ANOVA enquanto para dados de distribuição anormal utilizou-se o teste de Friedman e nas análises não pareadas, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis para dados com distribuição anormal, enquanto os que tiveram distribuição normal foram analisados por análise de variância (One-Way ANOVA).

Proporções em amostras qualitativas independentes foram comparadas por testes do Qui-quadrado (χ^2). Para todos os testes foi estabelecido um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da População do Estudo

5.1.1 Características demográficas da população de estudo

Os indivíduos que procuraram atendimento no Hospital da Fundação de Medicina Tropical, localizado na cidade de Manaus – AM e tiveram diagnóstico de malária vivax confirmado pelo método de gota espessa foram convidados a participar do estudo. Inicialmente foram recrutados 40 voluntários, porém, apenas 30 retornaram para a segunda coleta (D50) e no dia 180 apenas 12 compareceram. Além disso, três indivíduos foram diagnosticados com malária assintomática em D50 e seis indivíduos tiveram malária entre D50 e D180, sendo três assintomáticas. Dessa forma, as características dos indivíduos de cada grupo foram avaliadas, com base nas informações fornecidas pelos participantes, a fim de verificar a homogeneidade entre os grupos D0 (n = 40), D50 (n = 27) e D180 (n = 6) (Tabela 3).

Em relação ao gênero, não houve diferença significativa no número de homens e mulheres. As idades mínima e máxima dos indivíduos que compareceram nas coletas dos dias D0 e D50 foram de 20 anos e 68 anos respectivamente, enquanto a idade mínima dos indivíduos do grupo D180 foi de 31 anos e a máxima de 68 anos. O coeficiente de variação entre as idades em cada um dos grupos foi de 31,20 %, 26,27 % e 25,94 % respectivamente o que mostra uma heterogeneidade na distribuição, que pode influenciar nos parâmetros imunológicos de cada indivíduo, porém, a distribuição de idade entre os grupos foi homogênea (Tabela 3).

Entre todos os indivíduos avaliados em D0, 55% (22/40) relataram que já tiveram pelo menos um episódio de malária durante a vida e 45% nunca tiveram malária anteriormente. O número médio de episódios relatados foi de $3,3 \pm 3,3$. Ao serem questionados sobre a última ocorrência de malária, dos 22 indivíduos que relataram malárias prévias em D0, 22,7% (5/22) disseram que tiveram malária pela última vez há mais de 10 anos, 22,7% (5/22) relataram que o último episódio ocorreu há mais de 1 ano

e menos de 10 anos e 50% (11/22) tiveram há menos de um ano e mais de seis meses. Um indivíduo não soube responder a este questionamento.

Tabela 3. Características da população de estudo em cada segmento.

Características	D0 (n=40)	D50 (n=27)	D180 (n=6)	p *
% de homens	60,00	62,96	33,33	0,4017
Idade (mediana; min/máx)	(42,5; 20/68)	(43,0; 20/68)	(50,5; 31/68)	0,3957
Episódios de malária:				
Nunca teve malária	18	0	0	-
Um caso de malária	10	19	4	-
Mais de um caso de malária	12	8	2	-

DP: Desvio padrão; n^o: número. *Os valores de p foram calculados por Teste de Qui-quadrado para as variáveis qualitativas e Teste de Kruskal-Wallis para variáveis contínuas.

No D50 e D180, todos tiveram pelo menos um episódio de malária, visto que em D0 testaram positivo para a malária. Nesses dois momentos, o diagnóstico por gota espessa foi repetido. Todos os indivíduos que retornaram em D50 não relataram sintomas ou tiveram diagnóstico de malária nos períodos entre as coletas. No entanto, no momento que retornaram, 3/30 tiveram diagnóstico positivo de malária vivax enquanto no D180 3 relataram que tiveram malária após a segunda coleta e 3 foram identificados com malária subclínica, com diagnóstico positivo após teste de gota espessa. Dessa forma, neste trabalho separamos as análises no D180 em dois grupos: sem recorrência de malária (n = 6) e com recorrência de malária (n = 6). A parasitemia no D0 foi avaliada pelo número de parasitos por μL de sangue. A média foi de 2.685 parasitos/ μL de sangue (1.910 – 3.461; 95% CI).

Com o intuito de avaliar o perfil clínico, os participantes do estudo foram questionados sobre os sintomas nos 7 dias que antecederam o diagnóstico positivo de malária. Todos os participantes do estudo relataram algum sintoma relacionado à malária no D0. No total, foram observados catorze sinais clínicos associados à malária: calafrios, febre, cefaleia, sudores, fraqueza, artralgia, lombalgia, tontura, mialgia, perda de apetite, náuseas, dores abdominais, diarreia, vômito. Os sintomas mais comuns foram calafrios, febre e cefaleia 97,43%, 94,87% e 94,87% respectivamente. Além desses sintomas,

12,82% dos pacientes relataram ardência nos olhos (Figura 7). Nenhum sintoma foi reportado em D50 e D180.

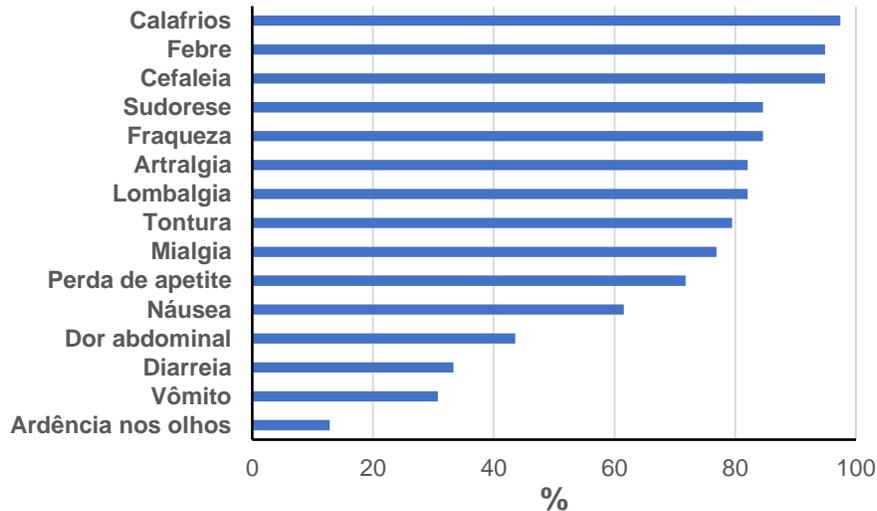


Figura 7. Frequência dos sintomas clínicos após infecção por *P. vivax*.

5.1.2 Parâmetros hematológicos

A caracterização dos parâmetros hematológicos durante a infecção e após tratamento foi realizada com os dados obtidos nos dias D0 e D50 (Figura 8). Cabe salientar que dois participantes não tiveram os dados do hemograma registrados devido a uma falha técnica do equipamento no dia da coleta. Além disso, os três indivíduos que foram diagnosticados com infecção assintomática em D50 foram desconsiderados desta análise.

A anemia não grave é caracterizada em adultos por níveis de hemoglobina (Hb) entre 7,0 a 11,9 g/dL, enquanto a anemia grave é definida por níveis de Hb < 7,0 g/dL e abaixo de 5 g/dL em crianças (WHO, 2015). Entre os indivíduos incluídos no estudo, 32% (8/25) apresentaram anemia não grave durante a fase aguda de malária vivax. Os níveis de Hb tiveram um aumento significativo após o tratamento contra a malária (Teste t; $p = 0,0052$) (Figura 8A). Não houve diferença significativa entre os valores do hematócrito (HCT) e o número de eritrócitos (RBC).

Na fase aguda observou-se uma queda no número de plaquetas (PLT) (Teste t; $p < 0,0001$) (Figura 8B). Esta diminuição é chamada de plaquetopenia ou trombocitopenia e é caracterizada como branda a moderada quando a contagem de plaquetas se encontra entre 50.000 e 150.000 plaquetas/mm³ de sangue. Já a trombocitopenia grave é caracterizada pela contagem de PLT $< 50.000/\text{mm}^3$ de sangue (WHO, 2015). Cerca de 92% (23/25) dos pacientes apresentaram plaquetopenia durante a fase aguda da doença, dentre eles 8% (2/25) apresentaram plaquetopenia grave.

Alterações nas contagens absolutas de leucócitos (WBC) e linfócitos também são frequentemente observadas durante a fase aguda de malária. A leucopenia é caracterizada pela contagem absoluta < 4.500 leucócitos/mm³. Esta alteração foi detectada na contagem de WBC em D0 (Teste de Wilcoxon; $p < 0,0001$) (Figura 8C). Foi visto que 44% (11/25) dos casos agudos de malária vivax estavam leucopênicos.

Por fim, foi avaliado o número de linfócitos totais e observou-se uma queda na fase aguda (Teste de Wilcoxon; $p < 0,0001$) (Figura 8D). A linfopenia é caracterizada pela contagem absoluta de < 1.500 linfócitos/mm³ de sangue. No total, 92% (23/25) dos pacientes agudos encontravam-se linfopênicos na fase aguda.

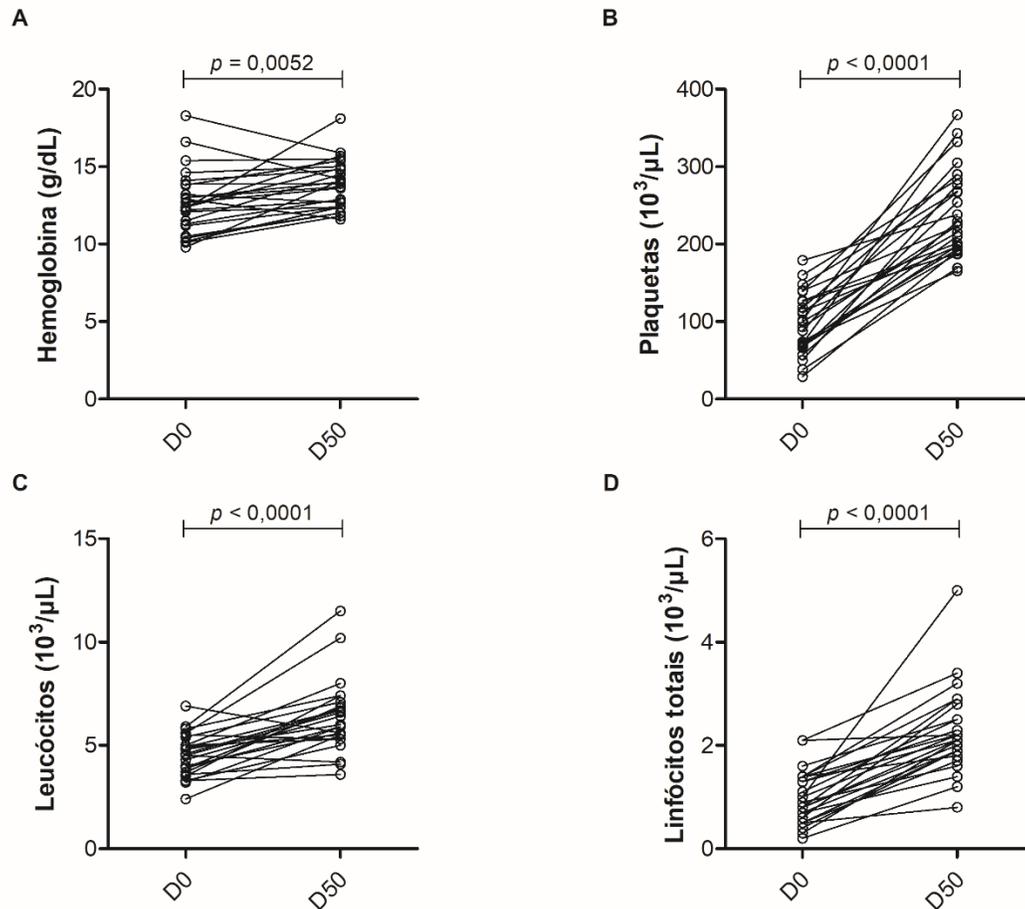


Figura 8. Parâmetros hematológicos durante e após infecção por *Plasmodium vivax*. Os indivíduos foram avaliados nos dias D0 e D50 (n = 25) quanto aos A) Níveis de hemoglobina (g/dL) B) Número de plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$), C) Número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$), D) Número de linfócitos totais.

5.1.3 Fenotipagem dos Linfócitos B

Para determinar o perfil fenotípico das células B em indivíduos com malária vivax e em fase de convalescença, as células B foram caracterizadas de acordo com o perfil dos seus marcadores de superfície e classificadas em células B imaturas, naive, células B de memória clássicas, atípicas, ativadas e plasmócitos. A frequência de células B totais foi determinada em relação ao total de células enquanto os outros subtipos de células B e MBC são representadas como porcentagem relativa às células B totais. As

alterações no perfil de cada subtipo de células B (aumento ou diminuição) foi determinado tendo como referência os controles negativos endêmicos (CNE).

Primeiramente, foi realizada a análise com todas as amostras de indivíduos que compareceram nos dias D0 e D50 e que não apresentaram parasitemia no D50 ($n = 27$). Nesses indivíduos, foi visto que a população de células B totais teve um aumento significativo em D50 quando comparado ao D0 (Teste t; $p = 0,0163$) (Figura 9A). A população de células B imaturas declinaram em D50 (Teste de Wilcoxon; $p = 0,0038$) (Figura 9B). Além disso, durante o episódio de malária, os plasmócitos apresentaram-se com frequência elevada, diminuindo significativamente em D50 (Teste de Wilcoxon; $p = 0,0009$) (Figura 9F), enquanto as células B naive estavam aumentadas em D50 comparado ao D0 (Teste t; $p = 0,0010$). Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências de MBC clássicas, atípicas e ativadas entre D0 e D50 (Figura 9 C-E e G).

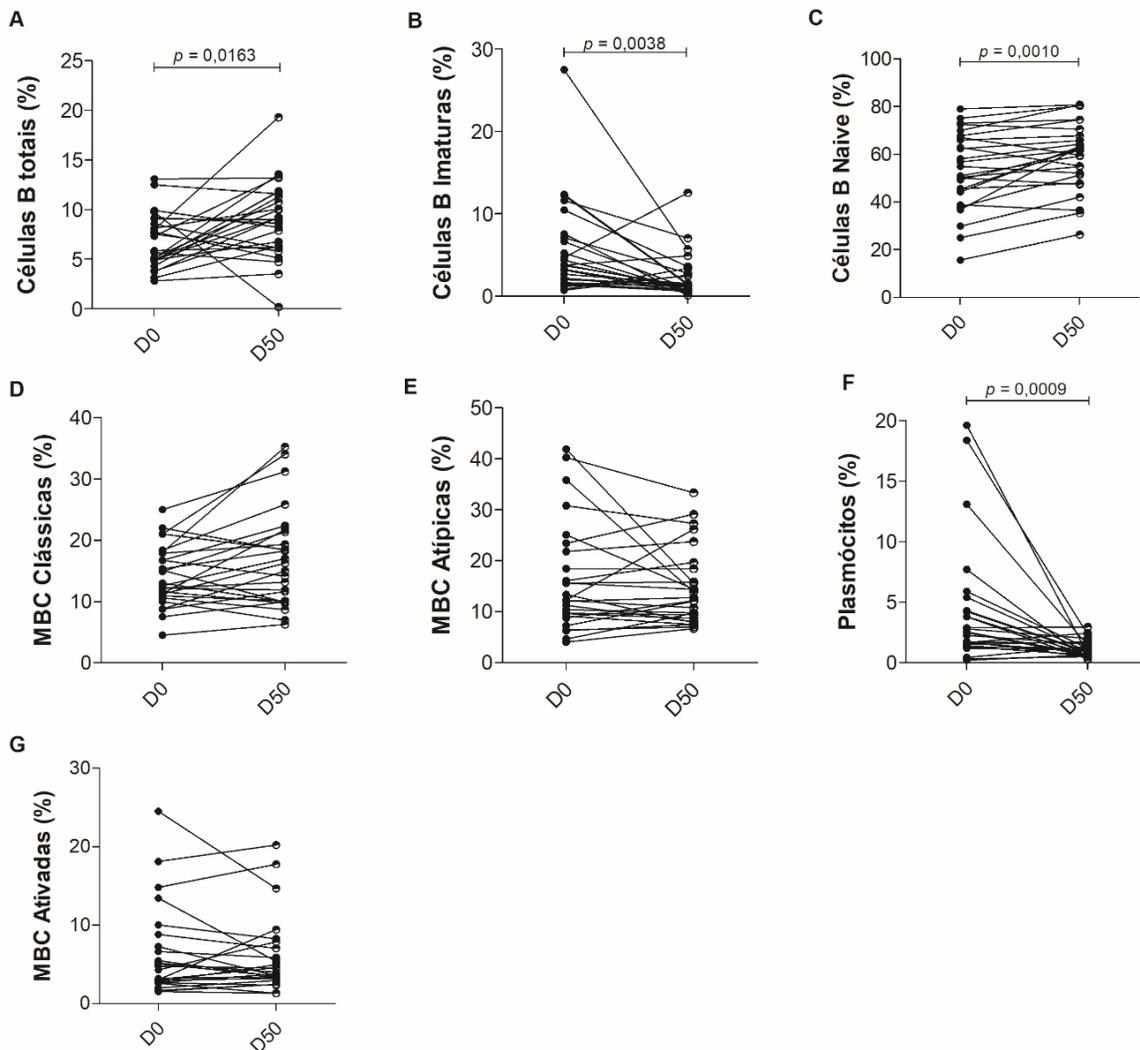


Figura 9. Subtipos de células B de indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira durante fase aguda (D0) e convalescência (D50). (A) Porcentagem de células B totais, (B) Células B Imaturas, (C) Naive, (D) Clássicas, (E) Atípicas, (F) Plasmócitos, (G) Ativadas. Cada círculo representa uma amostra em D0 e D50 (n = 27).

Posteriormente, foram avaliados os perfis de células B de indivíduos que compareceram aos três dias de coleta. É importante lembrar que no D180 seis dos doze indivíduos tiveram recorrência de malária após a coleta do D50. Portanto, foram realizadas duas análises comparativas entre D0, D50 e D180: indivíduos com recorrência (n = 6) e sem recorrência (n = 6).

A Figura 10 mostra o perfil fenotípico das células B dos indivíduos que não tiveram nova infecção por malária nos dias D50 e D180. Não houve diferença significativa

na frequência de anticorpos entre os três pontos. Quando analisado o perfil de células B dos indivíduos que tiveram recorrência de malária entre D50 e D180, observou-se que a população de MBC atípicas aumentou significativamente em D180 quando comparada a D50 (Teste de Friedman, $p = 0,0120$) (Figura 11).

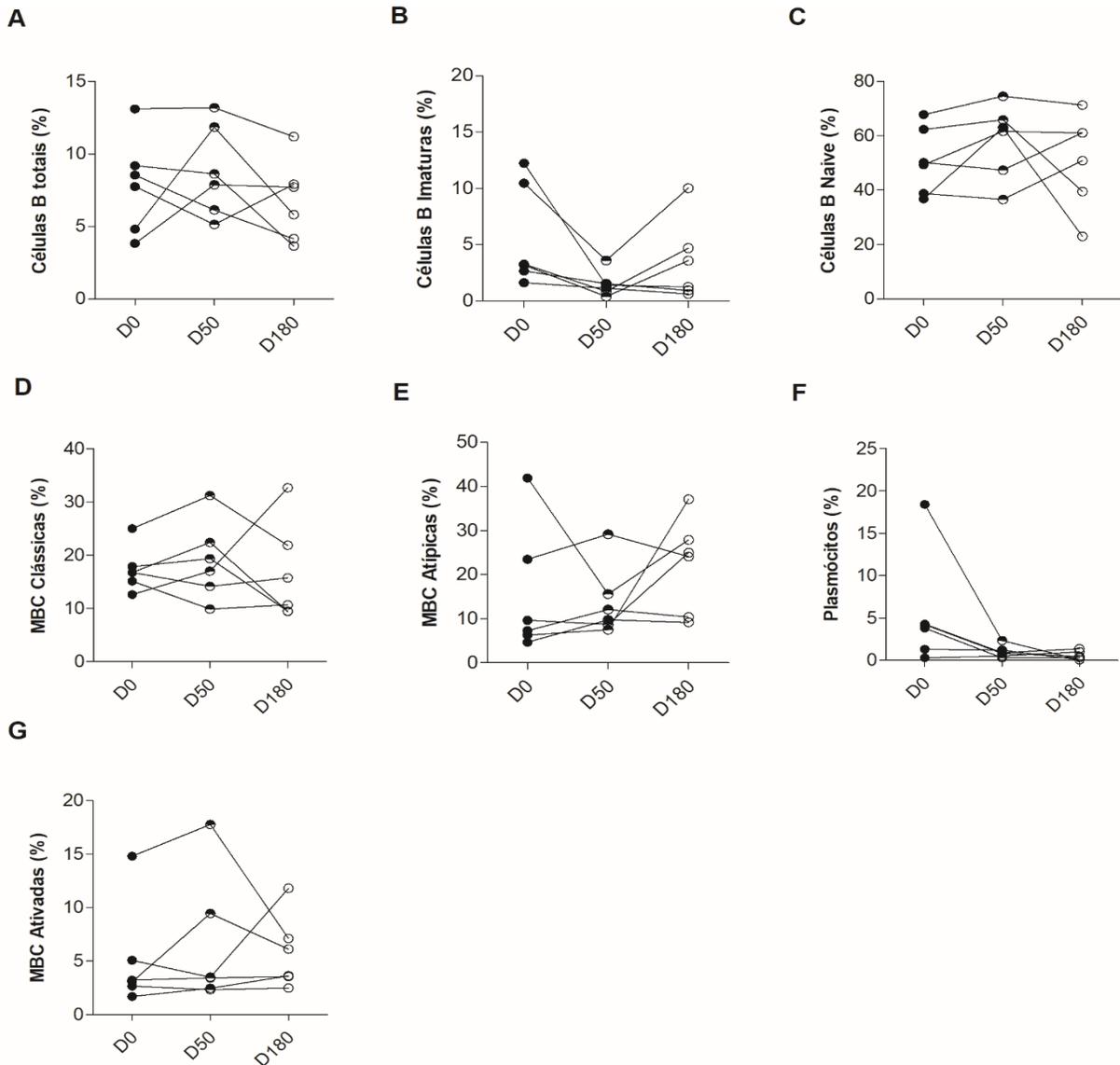


Figura 10. Subtipos de células B de indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira durante fase aguda e convalescência sem recorrência de malária durante os segmentos. A) Porcentagem de células B totais, (B) Células B Imaturas, C) Naive, D) Clássicas, E) Atípicas, F) Plasmócitos, G) Ativadas. Cada círculo representa uma amostra em D0, D50 e D180.

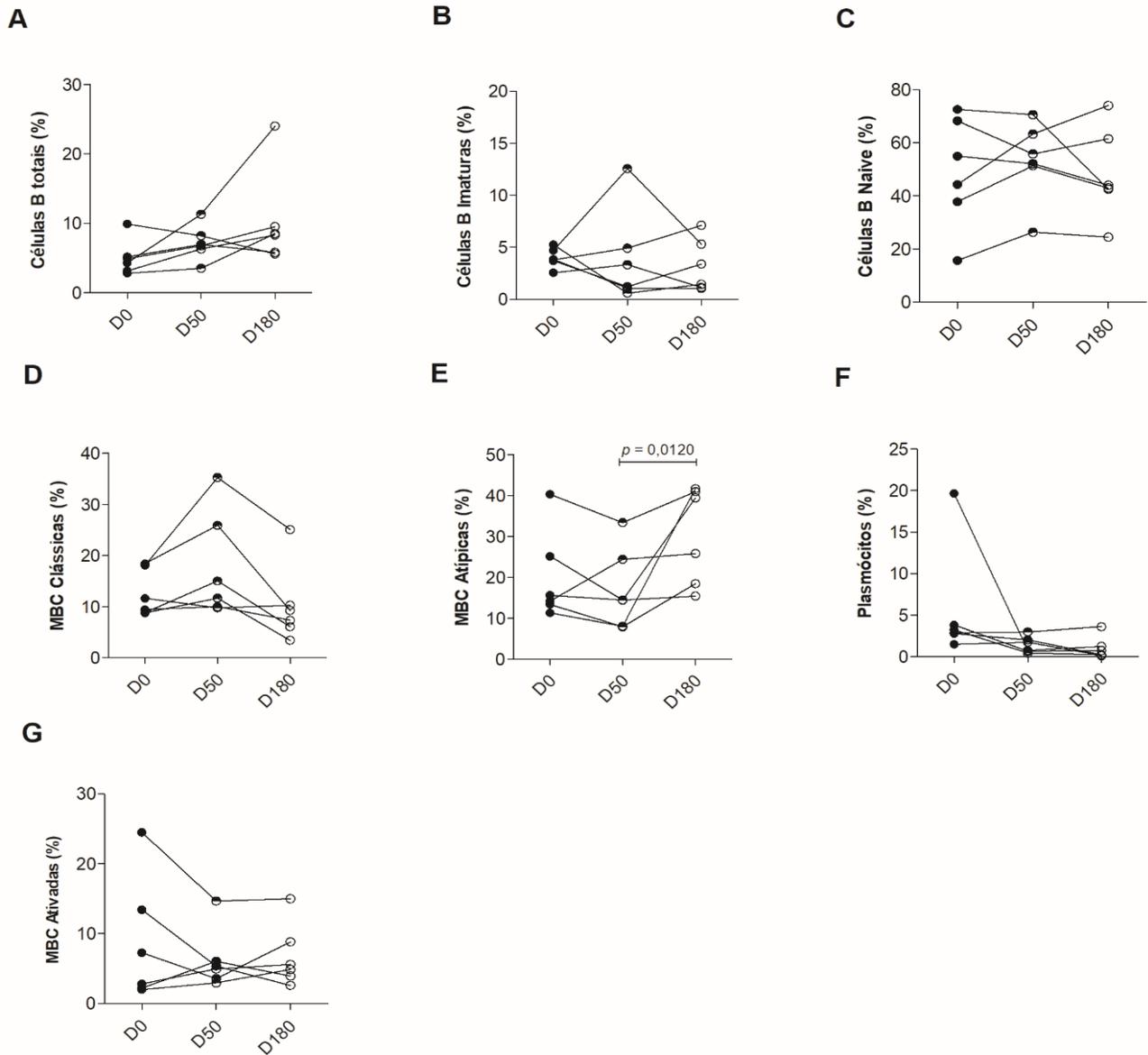


Figura 11. Subtipos de células B de indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira durante fase aguda e convalescência com recorrência de malária após D50. A) Porcentagem de células B totais, (B) Células B Imaturas, (C) Naive, (D) Clássicas, (E) Atípicas, (F) Plasmócitos, (G) Ativadas. Cada círculo representa uma amostra em D0, D50 e D180.

Por fim, foram avaliados os subtipos de células B apenas no D180 sem e com reincidência de malária vs. CNE, a fim de verificar se a exposição subsequente interfere na frequência de células B específicas. Apesar terem sido observadas tendências de

aumento em alguns pontos, como de MBC clássicas nos indivíduos sem recorrência e MBC atípicas em indivíduos com recorrência, não foram detectadas diferenças significativas entre os dois grupos e o grupo controle (Figura 12).

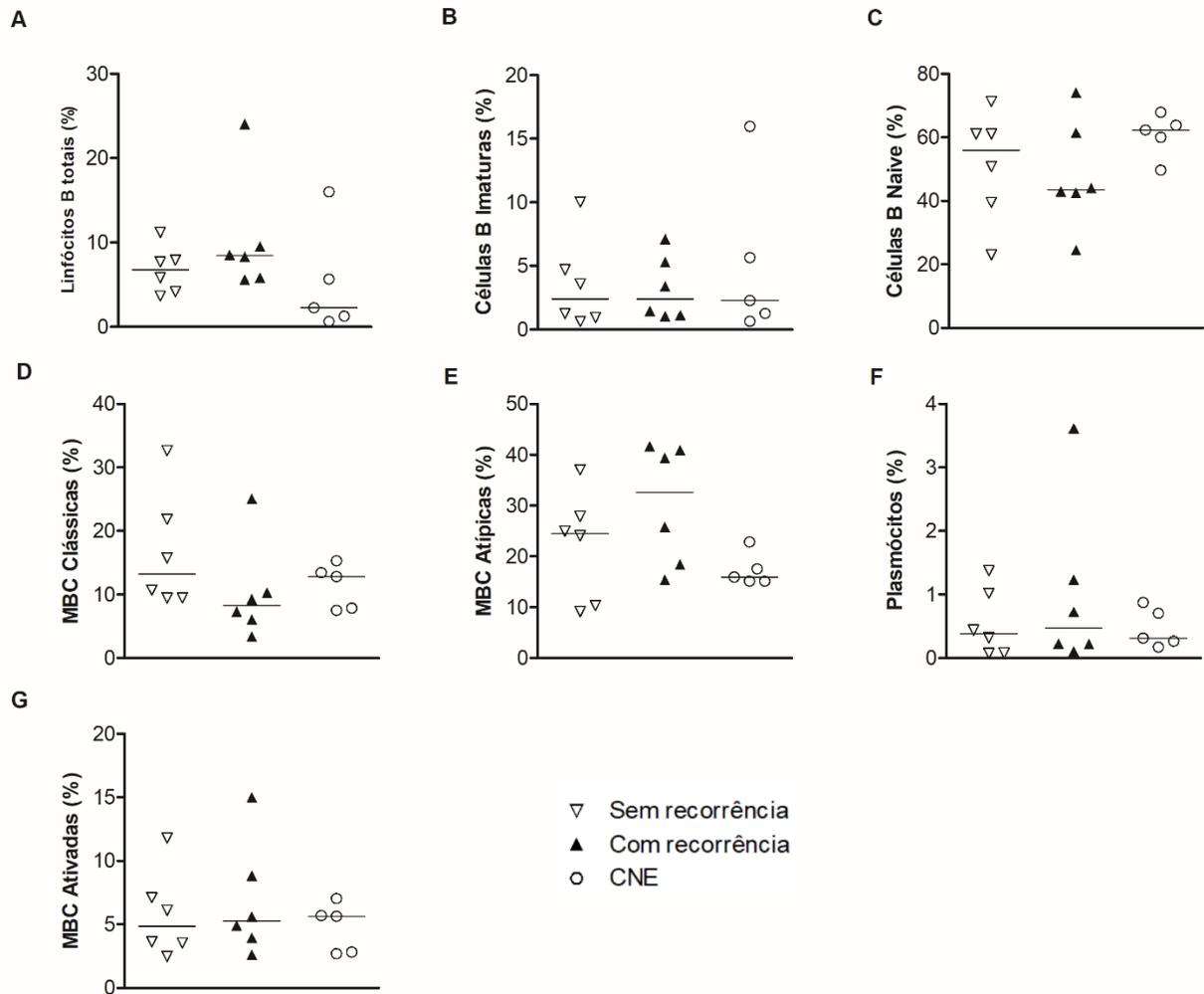


Figura 12. Comparação entre os subtipos de células B no D180 de indivíduos sem e com recorrência de malária e controle não endêmico. (A) Porcentagem de células B totais, (B) Células B Imaturas, (C) Naive, (D) Clássicas, (E) Atípicas, (F) Plasmócitos, (G) Ativadas. CNE = controle não endêmico. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

5.2 Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra os antígenos PvAMA1V5 e PvAMA1V16

As proteínas recombinantes PvAMA1V5 e PvAMA1V16, expressas em *E. coli Arctic Express (DE3)*, conforme descrito no capítulo 1, foram utilizadas nos testes de imunorreatividade por ELISA a fim de detectar a presença de anticorpos IgG e IgM nos plasmas dos pacientes nas fases aguda e de convalescença.

Primeiramente, foi realizada a comparação entre D0 e D50 (n=27). Foi visto que 59,3% dos indivíduos apresentaram resposta de anticorpos IgG para PvAMA1V5 durante a fase aguda e, 50 dias após o início do tratamento, 55,5% dos indivíduos ainda tinham anticorpos circulantes contra o antígeno. Não houve diferença significativa na frequência de respondedores, porém, houve diferença significativa em relação ao nível de anticorpos, que foi maior em D50 em comparação ao D0 (Teste de Wilcoxon; $p = 0,0113$) (Figura 13 A). Entre todos os indivíduos positivos em D50, apenas um não havia apresentado resposta de IgG positiva em D0.

Um resultado um pouco diferente foi visto para a proteína PvAMA1V16, que mostrou que 62,6% tiveram resposta IgG em D0 e 66,5% em D50. No entanto, em relação à magnitude da resposta, não foram observados níveis de IgG significativamente diferentes entre os dois tempos (Figura 13 D). Dos indivíduos positivos em D50, 88,9% (16/18) já tinham apresentado resposta de IgG em D0, os outros 11,1% (2/18) foram positivos apenas em D50.

Em seguida, foi analisada a resposta de IgG, nos três tempos de coleta, em indivíduos sem (n = 6) e com recorrência de malária durante os últimos 130 dias (n = 6). As frequências de respondedores no grupo sem segunda exposição à malária, para PvAMA1V5 foi de 83,3% (D0), 66,6% (D50) e 33,3% (D180) e para PvAMA1V16 foi de 83,3% (D0), 83,3% (D50) e 33,3% (D180). Para o grupo que foi reexposto à malária as frequências para PvAMA1V5 foram: 33,3% (D0), 66,6% (D50) e 100% (D180) e para PvAMA1V16: 50% (D0), 66,6% (D50) e 100% (D180).

Não houve diferença significativa entre os índices de reatividade nos três pontos para PvAMA1V5, mas observou-se uma tendência de queda dos níveis de IgG

em D180 em relação a D0 (Figura 13 B). Enquanto para a proteína PvAMA1V16 observou-se que os níveis de anticorpos foram significativamente menores em D180 comparado ao D0 (ANOVA, $p = 0,0472$) (Figura 13 E). Nas análises entre os três tempos, no grupo com recorrência, não foi evidenciada diferença estatística entre os índices de reatividade contra nenhuma das proteínas (Figura 13 C e F).

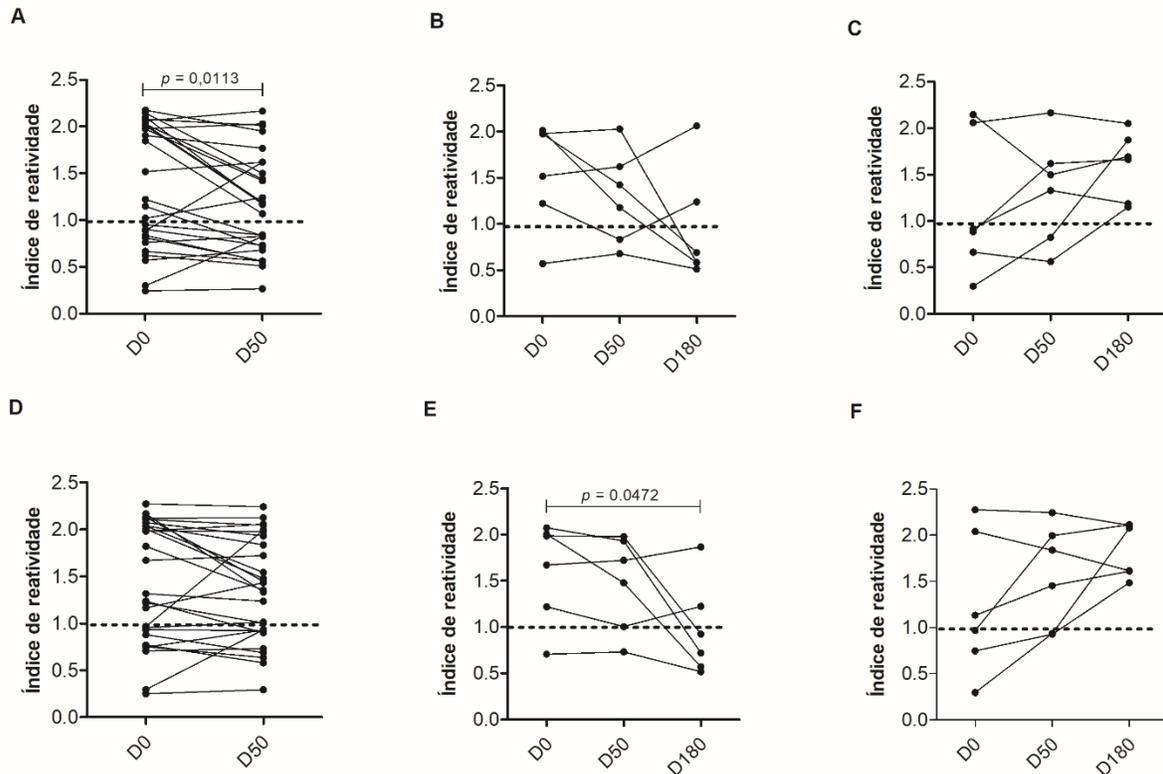


Figura 13. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 na fase aguda e convalescência. Os gráficos representam os índices de reatividade durante a fase aguda e convalescência contra os antígenos PvAMA1V5 (A, B e C) e PvAMA1V16 (D, E e F) em análises pareadas entre os dias D0 e D50 (A e D), D0, D50 e D180 sem recorrência (B e E) e D0, D50 e D180 com recorrência (C e F). A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR.

Observou-se que, aparentemente, os níveis de anticorpos em D180, entre os grupos de indivíduos sem e com reexposição à malária foram diferentes. Por isso, foi feita uma análise entre os índices de reatividade de IgG em D180 entre esses grupos. Observa-se que os níveis de anticorpos anti-PvAMA1V16 são mais altos nos grupos

reexpostos (Teste t; $p = 0,0049$) e para PvAMA1V5 foi visto essa mesma tendência (Figura 14).

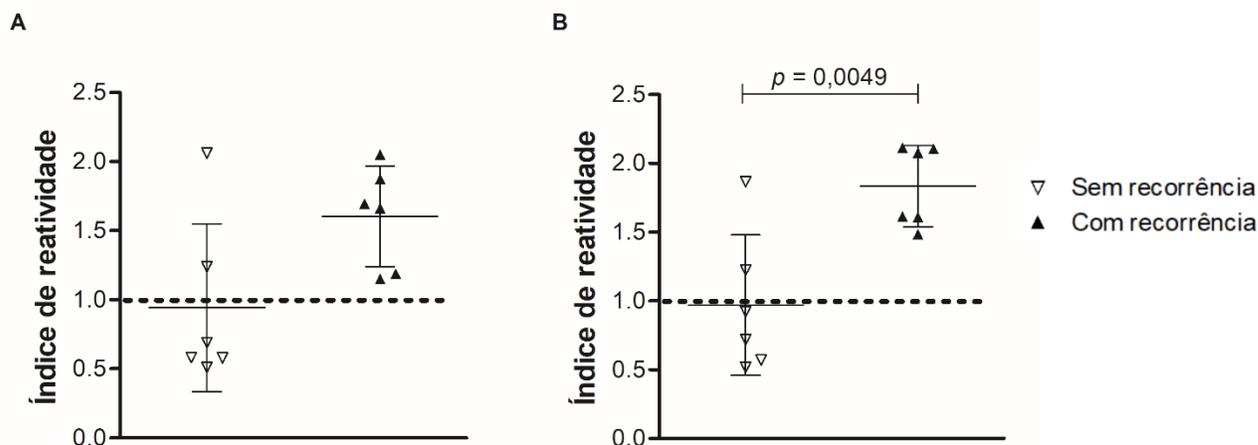


Figura 14. Índices de reatividade de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra as proteínas PvAMA1V5 e PvAMA1V16 em D180 em indivíduos com e sem reexposição à malária. A) Reatividade contra o antígeno PvAMA1V5 no D180 em indivíduos sem e com reexposição à malária nos últimos 130 dias ($n = 6$), B) Reatividade contra o antígeno PvAMA1V16 no D180 em indivíduos sem e com reexposição à malária nos últimos 130 dias. A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR. A média de cada grupo foi indicada pela linha horizontal \pm DP.

Dentre os indivíduos com malária vivax em D0, a maioria apresentou anticorpos contra ambas proteínas 59,25%. Um apresentou anticorpos apenas contra PvAMA1V16 (3,70%) e 37,03% dos indivíduos não responderam para nenhuma das proteínas. No D50, 55,6% tiveram resposta de IgG contra as duas proteínas, 11,1% apenas contra PvAMA1V16 e 33,3% não tinham anticorpos contra nenhuma das duas proteínas. No D180 todos os indivíduos responderam da mesma forma. No que diz respeito à capacidade antigênica, foi visto que ambos os antígenos geraram resposta de anticorpos em níveis semelhantes no grupo sem recorrência, mas no grupo com recorrência os índices de reatividade foram mais altos contra a proteína PvAMA1V16 (Teste t; $p = 0,0450$) (Figura 15).

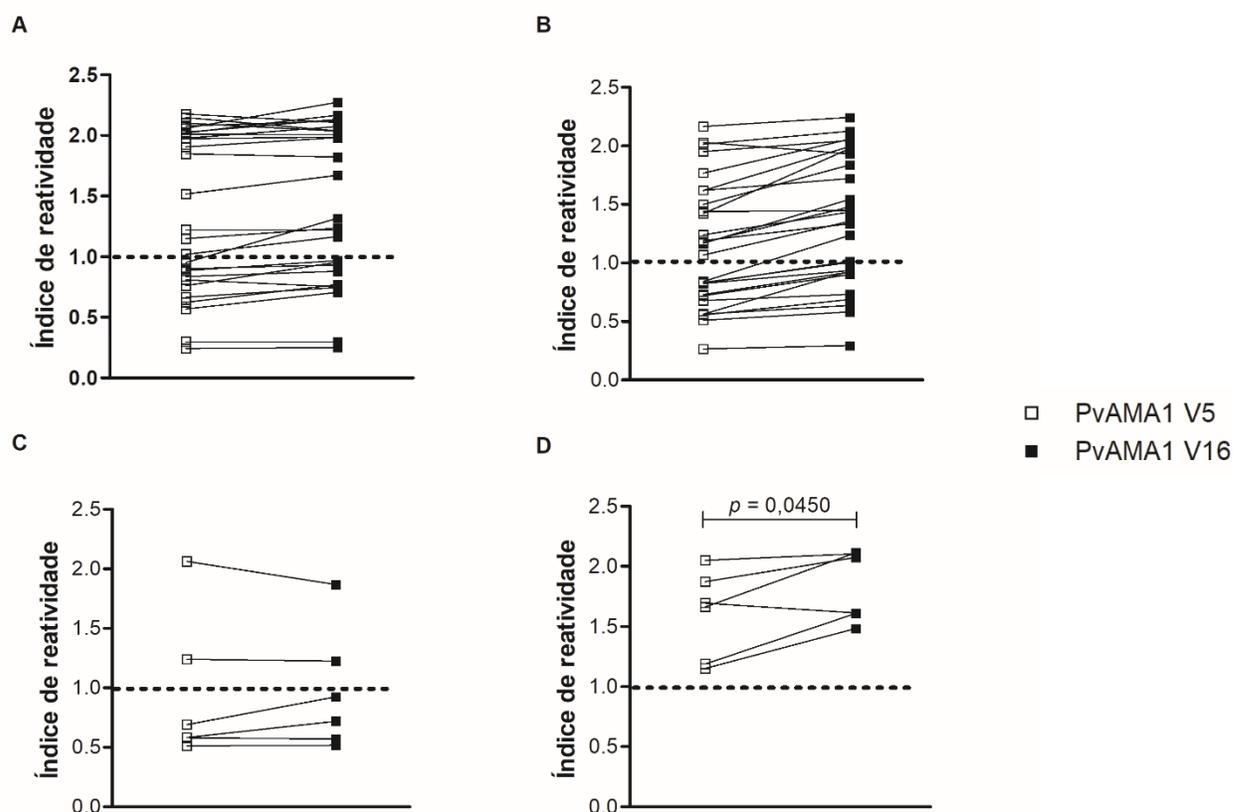


Figura 15. Comparação entre as respostas de anticorpos IgG naturalmente adquiridas contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 na fase aguda e convalescência. Os gráficos representam os índices de reatividade durante a fase aguda e convalescência contra os antígenos PvAMA1V5 e PvAMA1V16 em análises pareadas. A e B) D0 e D50 (n = 27) e C) D0, D50 e D180 sem reexposição (n = 6) e D) com reexposição (n = 6). A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR.

Após avaliação da presença de anticorpos naturalmente adquiridos contra cada uma das proteínas, foi verificado se havia diferença entre os subtipos de células B nos grupos de indivíduos respondedores e não respondedores contra cada uma delas nos dias D0 e D50. A Figura 16 mostra a comparação dos subtipos de células B no grupo com e sem resposta de IgG anti-PvAMA1V5 no D0. A porcentagem de células B totais de indivíduos respondedores foi maior em relação aos não respondedores (Teste Mann-Whitney; $p = 0,0043$). Não houve diferença significativa entre os outros fenótipos (Figura 16), assim como nenhuma diferença significativa foi vista no D50 (Figura 17).

O mesmo padrão foi observado entre respondedores e não respondedores contra PvAMA1V16 (Figuras 18 e 19).

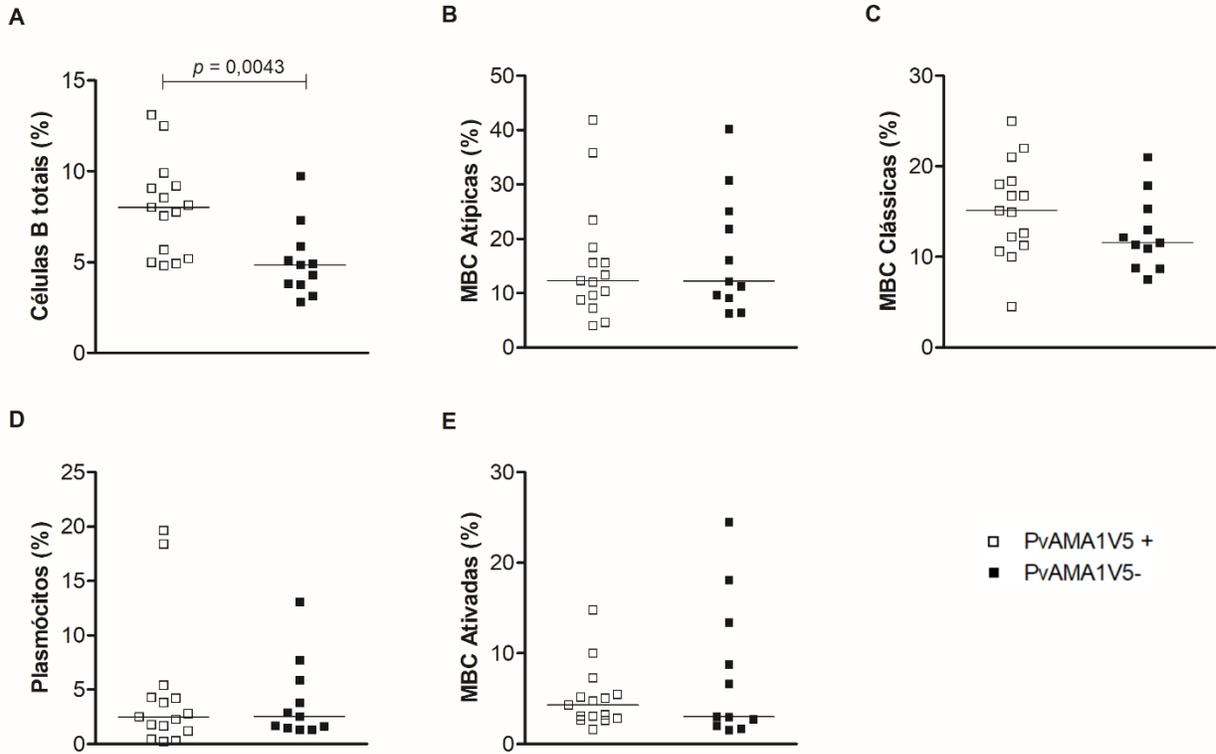


Figura 16. Frequências de células B totais e de memória nos indivíduos respondedores (IgG) contra proteína PvAMA1V5 durante a infecção por malária vivax (D0). A) Células B totais, (B) MBC atípicas, (C) MBC Clássicas, (D) Plasmócitos, (E) MBC Ativadas. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

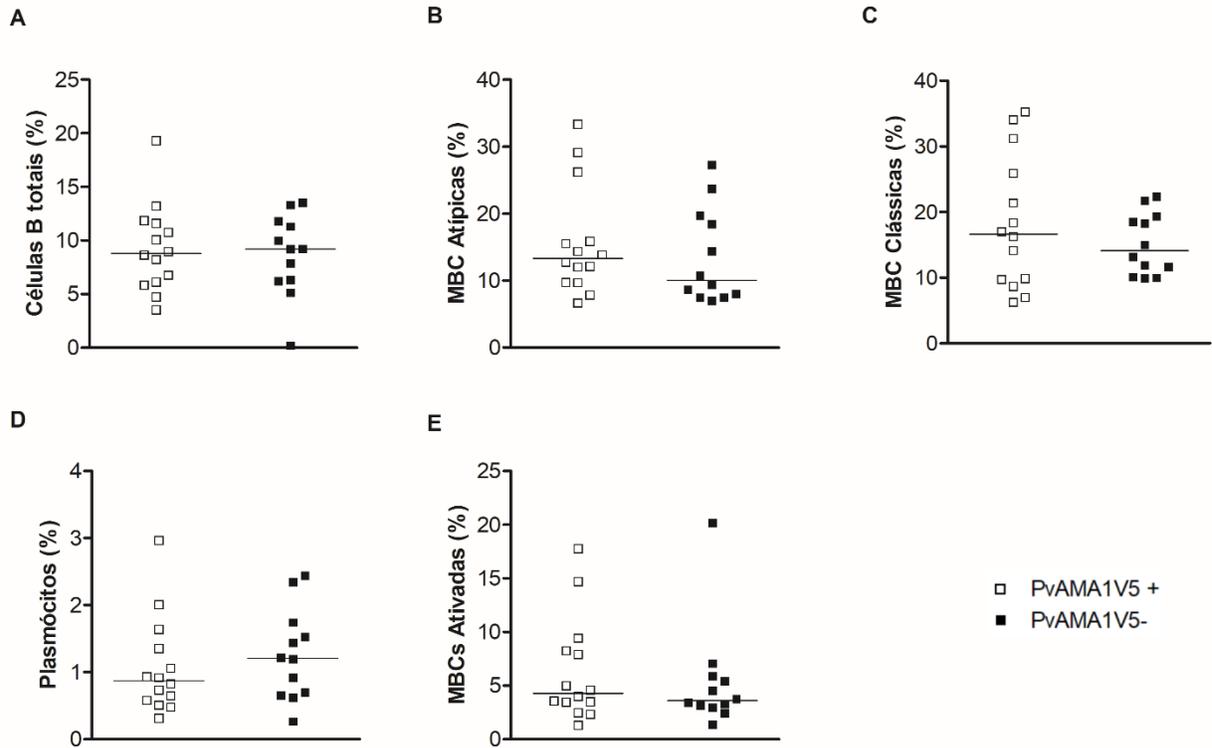


Figura 17. Frequências de células B totais e de memória nos indivíduos respondedores (IgG) contra a proteína PvAMA1V5 após infecção por malária vivax (D50). A) Células B totais, (B) MBC atípicas, (C) MBC Clássicas, (D) Plasmócitos, (E) MBC Ativadas. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

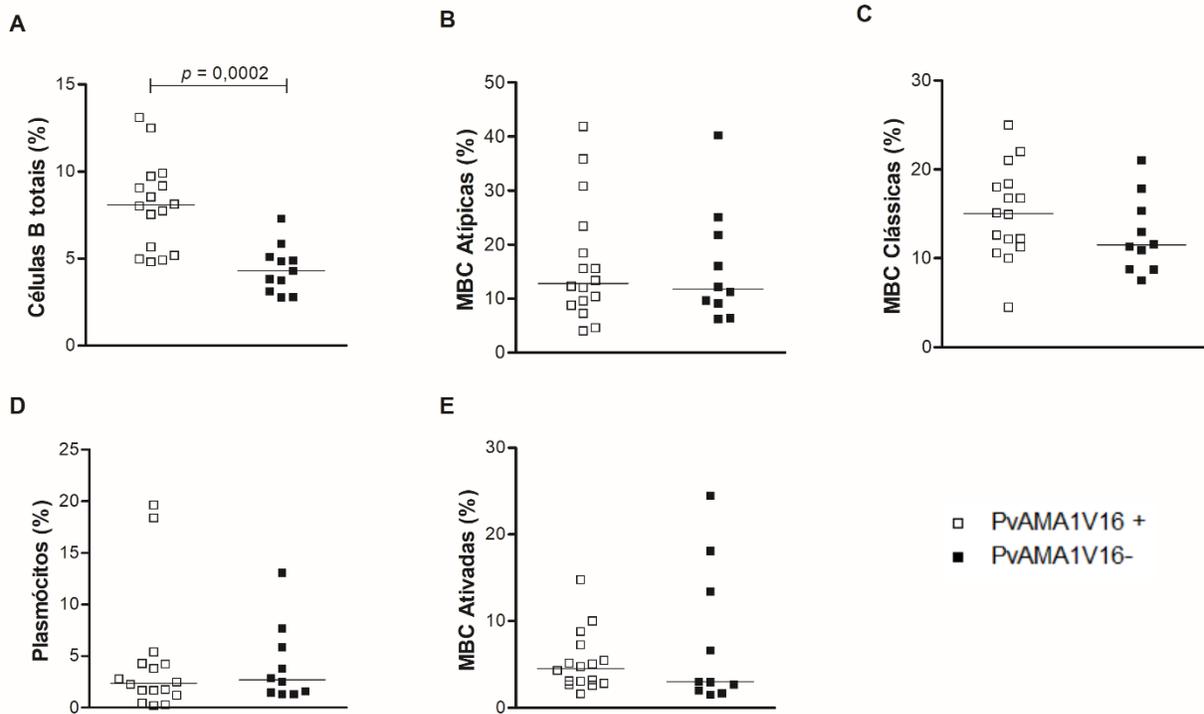


Figura 18. Frequências de células B totais e de memória nos indivíduos respondedores e não respondedores (IgG) contra proteína PvAMA1V16 durante a infecção por malária vivax (D0). A) Células B totais, (B) MBC atípicas, (C) MBC Clássicas, (D) Plasmócitos, (E) MBC Ativadas. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

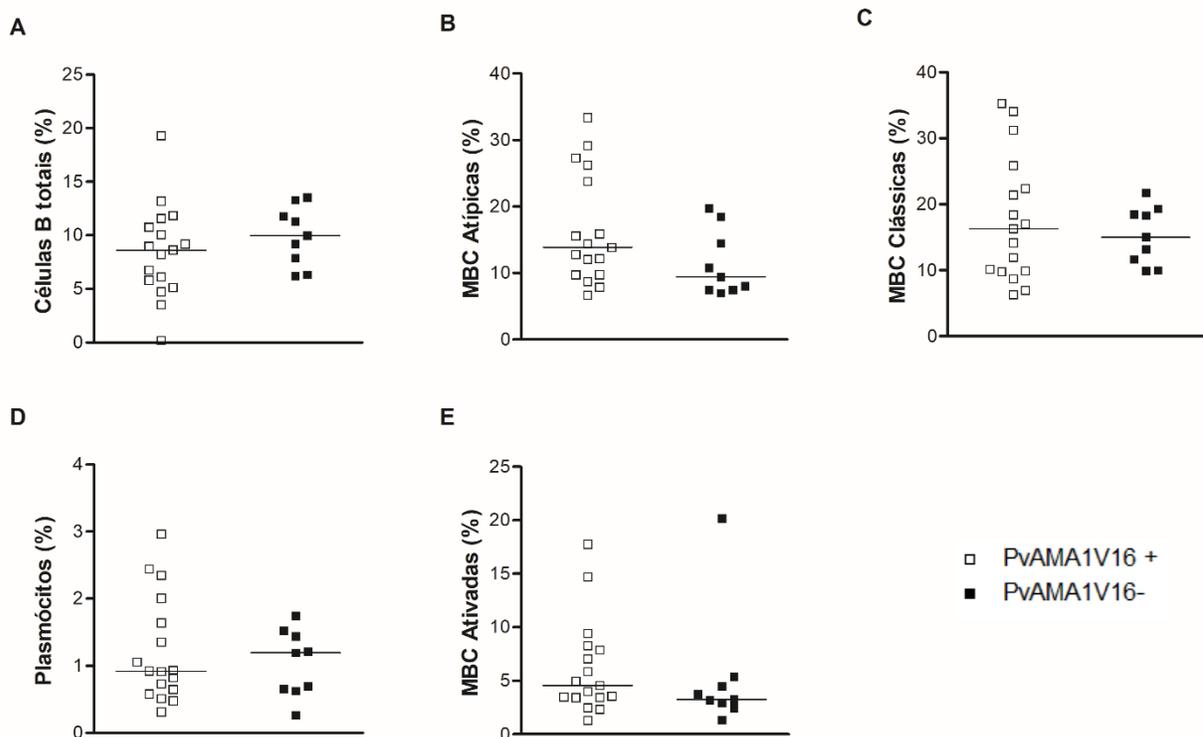


Figura 19. Frequências de células B totais e de memória nos indivíduos respondedores e não respondedores contra proteína PvAMA1V16 após infecção por malária vivax (D50). A) Células B totais, (B) MBC atípicas, (C) MBC Clássicas, (D) Plasmócitos, (E) MBC Ativadas. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

5.3 Resposta de anticorpos IgM naturalmente adquirida contra os antígenos PvAMA1V5 e PvAMA1V16

Além da análise dos índices de reatividade de IgG, também foram analisadas as reatividades de IgM contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16. Durante a infecção por malária vivax, 56,7% dos indivíduos tiveram resposta de anticorpos IgM contra o antígeno PvAMA1V5 e 70% contra PvAMA1V16. Em D50 houve uma queda significativa nos níveis de anticorpos IgM observando-se apenas 3,7% de resposta anti-PvAMA1V5 e 11,1% anti-PvAMA1V16 (Teste de Wilcoxon; $p < 0,001$). Quando analisados os três pontos de coletas sem e com reexposição em D180 foi visto um perfil semelhante com a queda da reatividade de IgM ao longo do tempo (Figura 20).

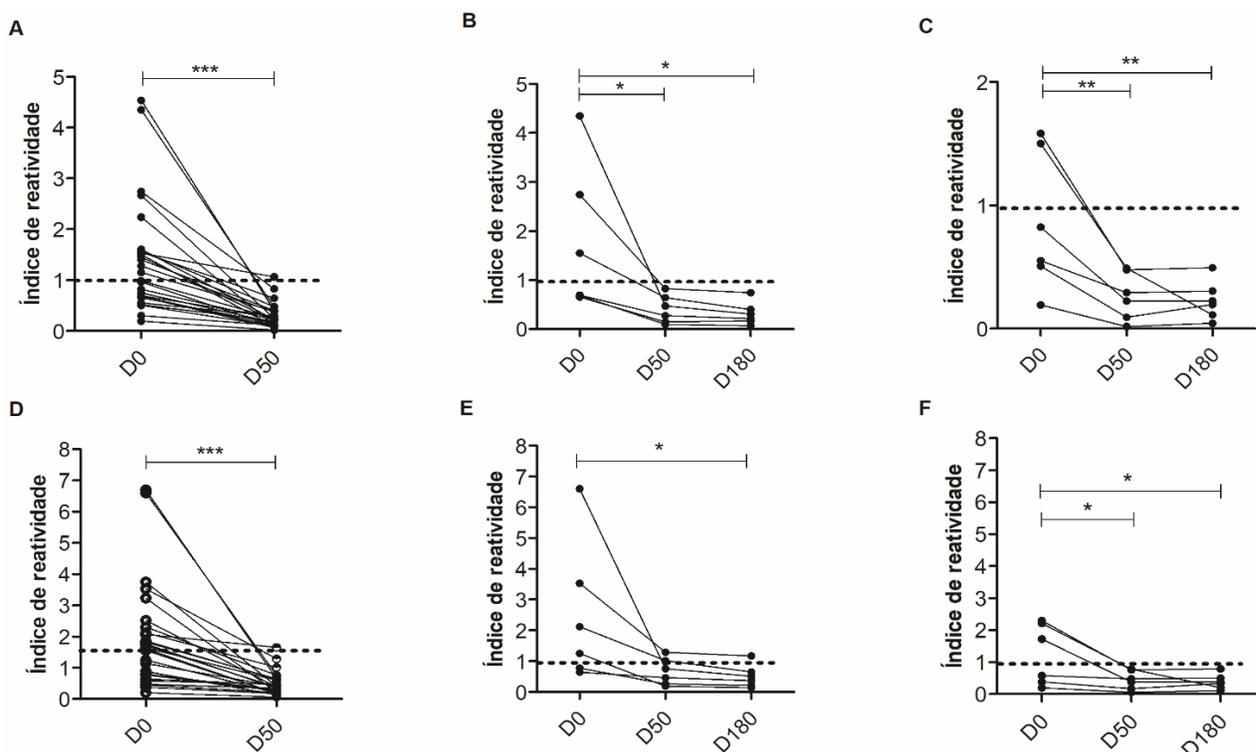


Figura 20. Resposta de anticorpos IgM naturalmente adquirida contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 na fase aguda e convalescência. Os gráficos representam os índices de reatividade durante a fase aguda e convalescência contra os antígenos PvAMA1V5 (A, B e C) e PvAMA1V16 (D, E e F) em análises pareadas entre os dias D0 e D50 (A e D). Os gráficos B e E representam os dados obtidos em D0, D50 e D180 apenas dos indivíduos que não tiveram recorrência de malária enquanto os gráficos C e F representam os dados de indivíduos que tiveram recorrência. A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR. Diferenças estatisticamente significativas são representadas nos gráficos por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

Uma vez que apenas em D0 observou-se um número maior de indivíduos respondedores, foi realizada a análise comparativa entre as respostas de IgM contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 durante a infecção. A proteína PvAMA1V16 induziu uma resposta de anticorpos IgM significativamente mais alta em relação à proteína PvAMA1V5 (Teste de Wilcoxon; $p < 0,0001$) (Figura 21).

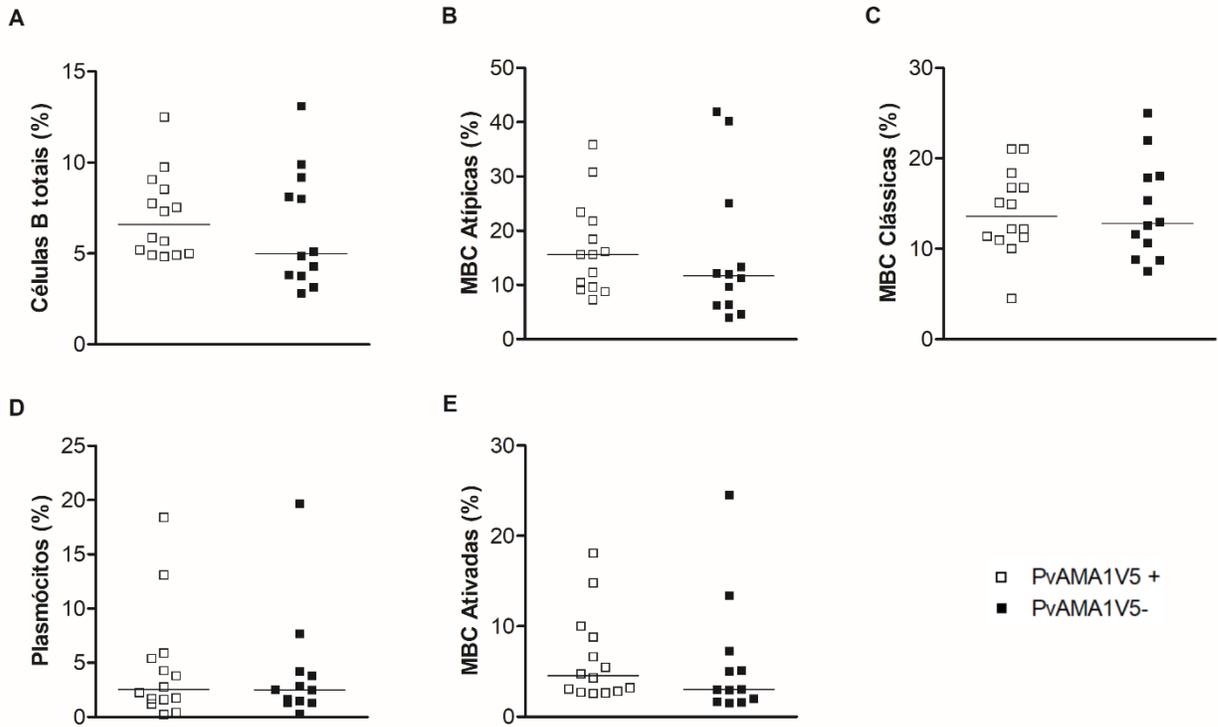


Figura 22. Frequências de células B totais e células B de memória nos indivíduos respondedores e não respondedores (IgM) contra proteína PvAMA1V5 durante infecção por malária vivax (D0). A) Células B totais, (B) MBC Atípicas, (C) MBC Clássicas, (D) Plasmócitos, (E) MBC Ativadas. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

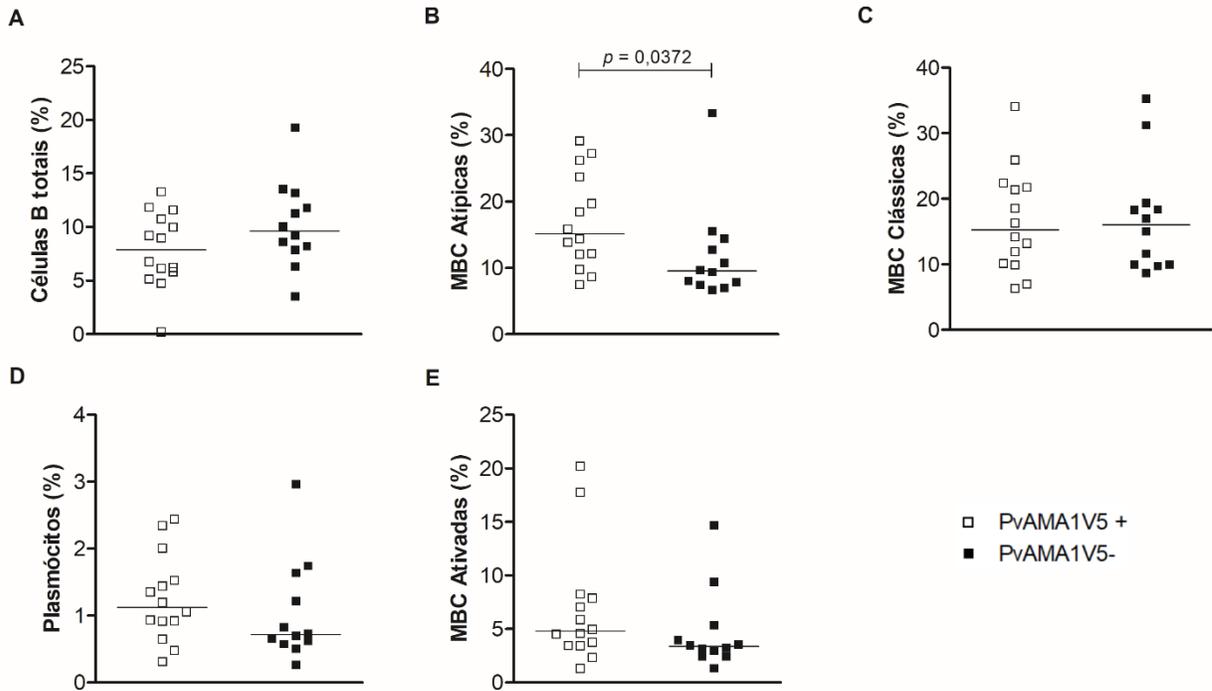


Figura 23. Frequências de células B totais e células B de memória nos indivíduos respondedores e não respondedores (IgM) contra proteína PvAMA1V5 após infecção por malária vivax (D50). A) Células B totais, (B) MBC Atípicas, (C) MBC Clássicas, (D) Plasmócitos, (E) MBC Ativadas. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

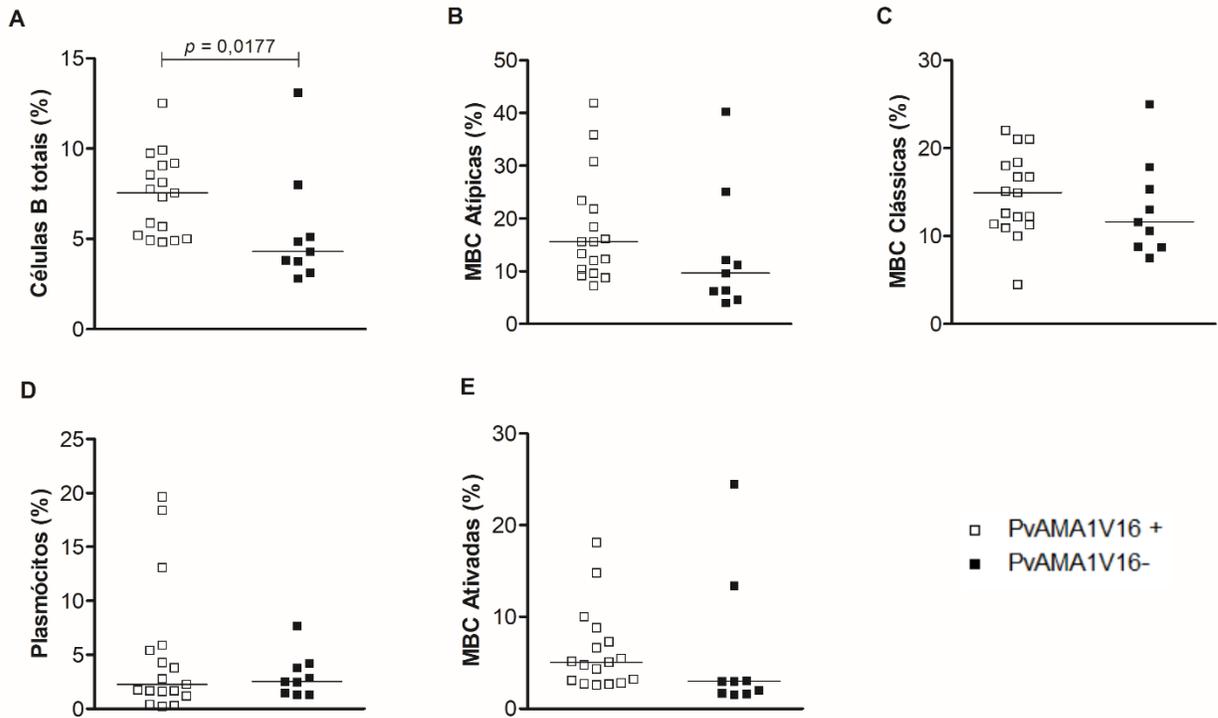


Figura 24. Frequências de células B totais e células B de memória nos indivíduos respondedores (IgM) contra proteína PvAMA1V16 durante infecção por malária vivax (D0). A) Células B totais, (B) MBC Atípicas, (C) MBC Clássicas, (D) Plasmócitos, (E) MBC Ativadas. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

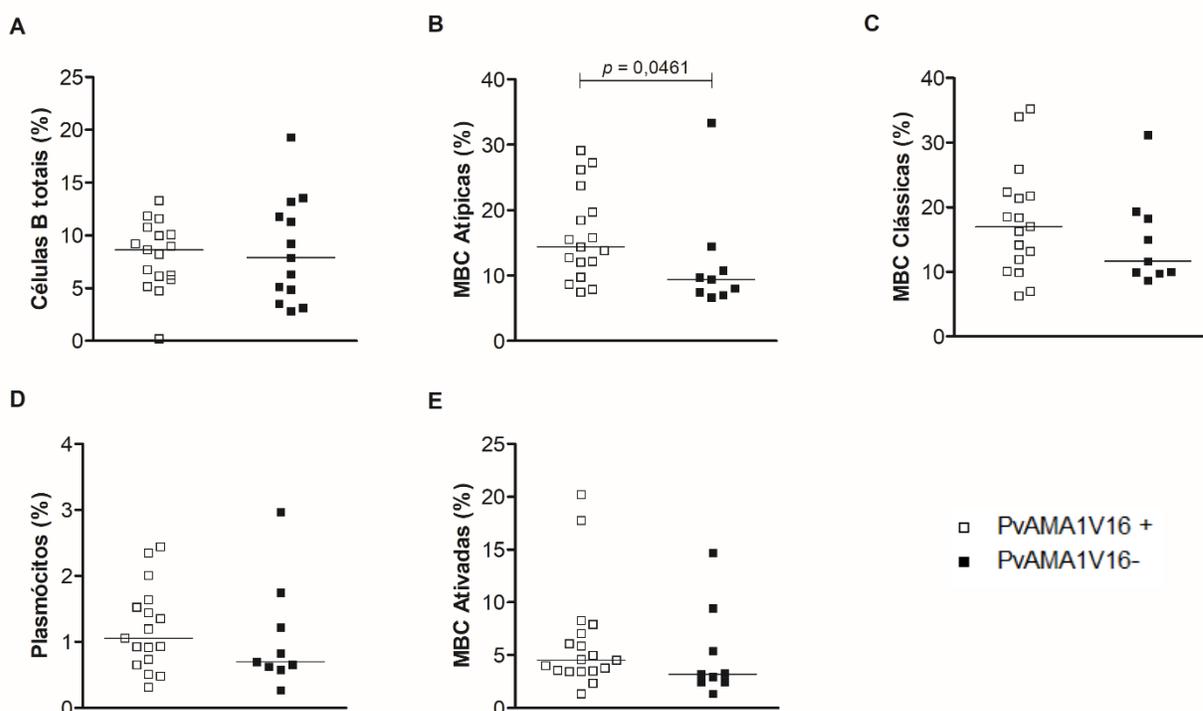


Figura 25. Frequências de células B totais e células B de memória nos indivíduos respondedores (IgM) contra proteína PvAMA1V16 após infecção por malária vivax (D50). A) Células B totais, (B) MBC Atípicas, (C) MBC Clássicas, (D) Plasmócitos, (E) MBC Ativadas. A mediana de cada grupo foi indicada pela linha horizontal.

5.4 Antígenos selecionados por análises *in silico*

Atualmente, abordagens computacionais são muito utilizadas para estudos na área de vacinologia, tanto na pesquisa de candidatos em estágios pré-clínico, clínico e pós-licenciamento de vacinas. Neste trabalho, as análises *in silico* foram realizadas para a seleção de potenciais candidatos vacinais. Para esta seleção utilizou-se os genes codificadores de proteínas anotados para o genoma de *P. vivax* (cepa Sal-1), depositados na plataforma PlasmoDB. Cinco candidatos foram selecionados com base nos melhores resultados obtidos nas análises de antigenicidade, epítomos lineares de células B e nas características de cada antígeno descritas no PlasmoDB (Tabela 4).

Tabela 4. Características das proteínas selecionadas por análises in silico.

ID	Score de Antigenicidade	n° epítomos de células		Perfil de transcrição					
		B	Taxa de mutação	(h)	AA	PM	PS	Ítrons	TMHMM
PVX_009	1.2099	29	2.75	30	2907	311599	sim	não	não
PVX_119	1.0118	4	1.46	36	293	32289	não	1	não
PVX_111	1.2543	8	1.09	36	485	52171	não	2	não
PVX_089	1.0629	6	2.41	48	428	44974	sim	2	não

ID= identificação do gene; h= horas; AA= n° de aminoácidos; PM= peso molecular; PS= peptídeo sinal; TMHMM= domínios transmembrana.

5.5 Expressão das proteínas recombinantes

Os genes *pvx_111*, *pvx_009*, *pvx119*, *pvx_089* foram inseridos no vetor pEGFP-N1. Após digestão com enzimas de restrição e corrida em gel de agarose foram detectadas as bandas nos seguintes tamanhos: *pvx_111*: 912 pb, *pvx_089*: 1487 pb, *pvx_009*: 1439 pb, *pvx_119*: 911pb.

Os plasmídeos pEGFP contendo os genes de *P. vivax* foram utilizados no teste de expressão em células HEK-293T, HeLa e CHO-745 a fim de selecionar a linhagem celular com maior taxa de transfecção. A partir dos experimentos de otimização da expressão em células eucariotas foi visto que todas as linhagens celulares foram transfectadas com os genes de *P.vivax*. As células transfectadas foram analisadas por microscopia de fluorescência, onde foi visto, por análise visual, que as células HEK-293T apresentaram mais células transfectadas, seguido das células CHO-745 e HeLa (Figuras 26-28). As taxas de tranfecção das células HEK-293T foram mensuradas por citometria de fluxo. As frequências de células transfectadas com cada gene foram: PVX_009-1: 31,4%, PVX_089: 15%, PVX_111: 26,5%, PVX_119: 31,4%.

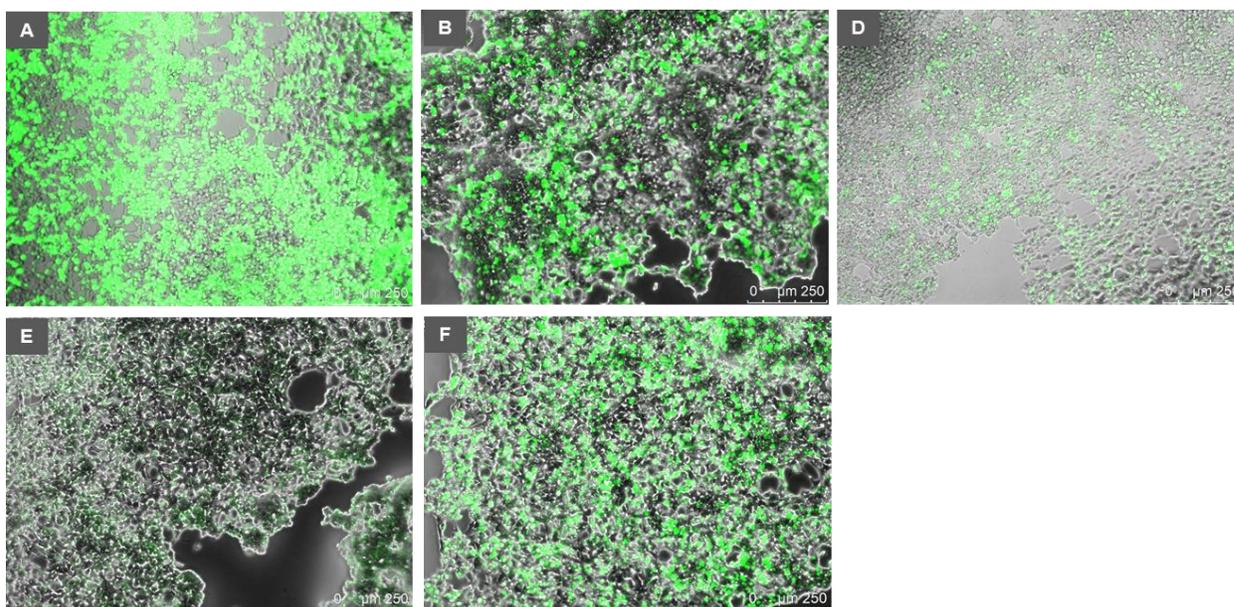


Figura 26. Transfecção de células HEK-293T. As imagens mostram as células HEK-293T transfetadas com cada um dos genes em células HEK-293T. A) Células transfetadas com pEGFP, B) pEGFP *pvx_111*, C) pEGFP *pvx_009-1*, D) pEGFP *pvx_089*, E) pEGFP *pvx_089*, F) pEGFP *pvx_119*.

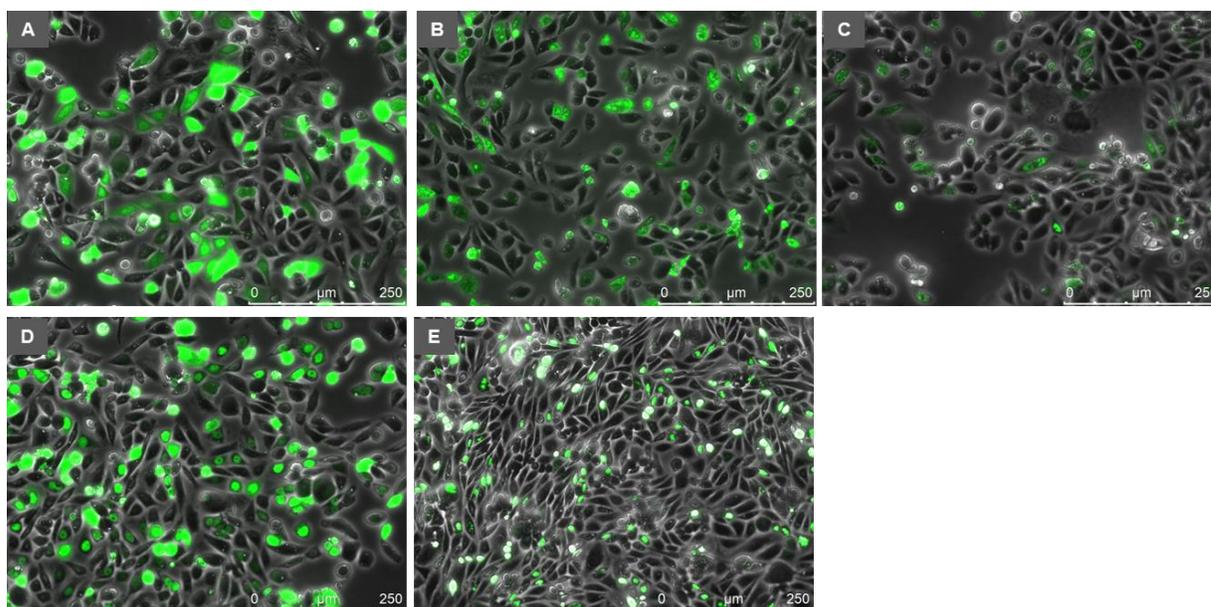


Figura 27. Transfecção de células CHO-745. As imagens mostram as células CHO-745 transfetadas com cada um dos genes. A) Células transfetadas com pEGFP, B) pEGFP *pvx_111*, C) pEGFP *pvx_009-1*, D) pEGFP *pvx_089*, E) pEGFP *pvx_119*.

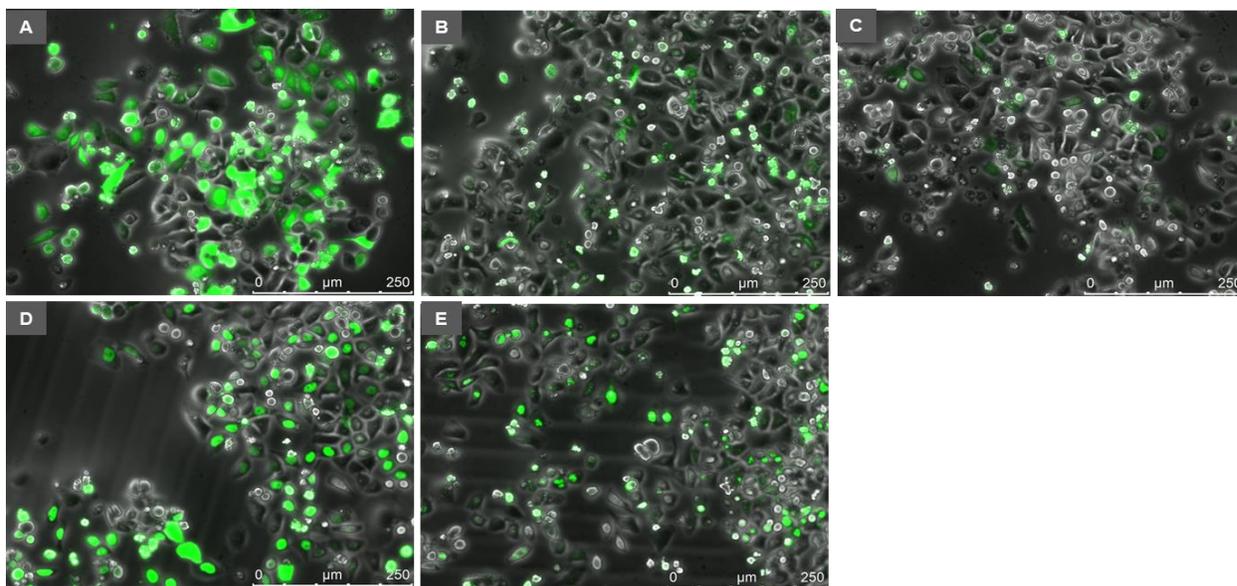


Figura 28. Transfecção de células HeLa. As imagens mostram as células HeLa transfectadas com cada um dos plasmídeos transformados. A) Células transfectadas com pEGFP, B) pEGFP *pvx_111*, C) pEGFP *pvx_009-1*, D) pEGFP *pvx_089*, E) pEGFP *pvx_119*.

5.6 Análise de reações inespecíficas entre as células e os plasmas imunes e não imunes

A escolha da linhagem celular para ser utilizada nos ensaios de imunoreconhecimento foi feita considerando a maior taxa de transfecção e a ausência de ligação inespecífica frente ao plasma de indivíduos imunes e não imunes. Para avaliar a reatividade inespecífica, as células CHO-745, HEK-293T e HeLa foram incubadas com um *pool* de plasmas de indivíduos imunes e com um *pool* de não-infectados e em seguida foi realizada a análise por citometria de fluxo.

As células CHO-745 apresentaram um leve deslocamento do pico de reatividade quando em contato com o plasma imune (Figura 29A), as células HEK-293T não apresentaram reatividade frente aos plasmas imunes e não imunes (Figura 29B) e as células HeLa apresentaram reatividade quando em contato com o plasma imune e não imune (Figura 29C).

Desta forma, além de apresentarem a maior taxa de transfecção, as células HEK-293T não apresentaram reação inespecífica com anticorpos presentes no plasma, portanto, esta foi a linhagem escolhida para os ensaios de imunorreatividade.

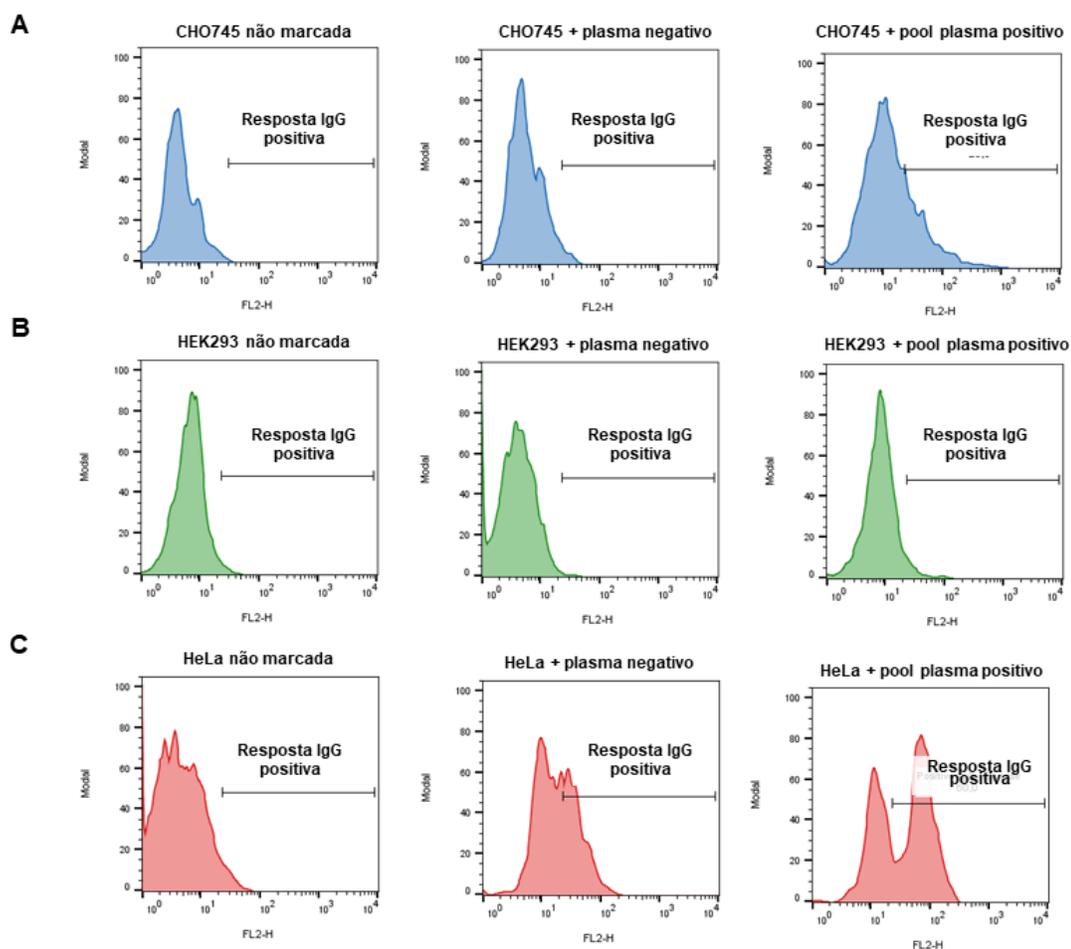


Figura 29. Reatividade inespecífica entre células e plasmas de indivíduos imunes e não imunes. A) células CHO-745, B) células HEK-293T e C) células HeLa.

5.7 Ensaio de imunorreatividade para detecção de anticorpos IgG contra os antígenos de *P. vivax*

Após a expressão das proteínas recombinantes em células HEK-293T foi feita uma avaliação inicial da antigenicidade de cada um dos candidatos. Para isso, células

expressando cada um dos antígenos de *P. vivax* foram incubadas com plasma de indivíduos infectados e convalescente. A reatividade de anticorpos específicos contra cada uma das proteínas foi avaliada por citometria de fluxo.

Observou-se que todos os candidatos avaliados se mostraram antigênicos em níveis variados (Figuras 30 - 33). Os antígenos PVX089, PVX119 foram os que tiveram a maior frequência de IgG ao longo do tempo, uma vez que a porcentagem de indivíduos IgG positivos se manteve em 100% até 180 dias depois do episódio de malária (Figuras 30 e 31). No entanto, ambos tiveram uma redução significativa na reatividade tanto entre os dias D0 e D50 quanto D0, D50 e D180 (Figuras 30 e 31, gráficos A e B). Na análise dos índices de reatividade durante a fase aguda e convalescência entre indivíduos com recorrência entre D50 e D180 essa diferença estatística não foi vista, visto que houve um aumento da reatividade em D180 (Figuras 30 e 31C).

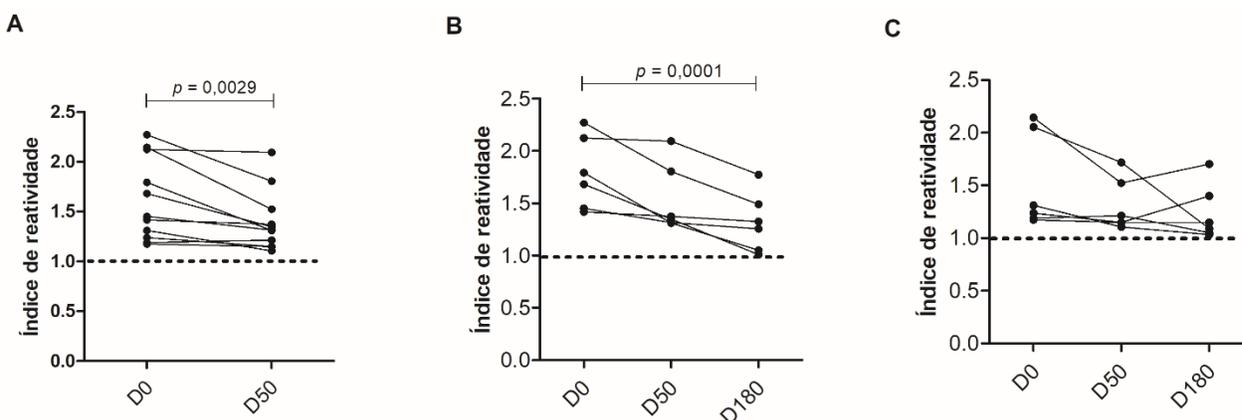


Figura 30. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra o antígeno PVX_089 de *Plasmodium vivax*. A) Índices de reatividade durante a fase aguda e convalescência nos dias D0 e D50 (n = 6), B) Índices de reatividade em D0, D50 e D180 entre os indivíduos sem recorrência de malária entre D50 e D180, C) Índices de reatividade em D0, D50 e D180 em indivíduos com recorrência. A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR.

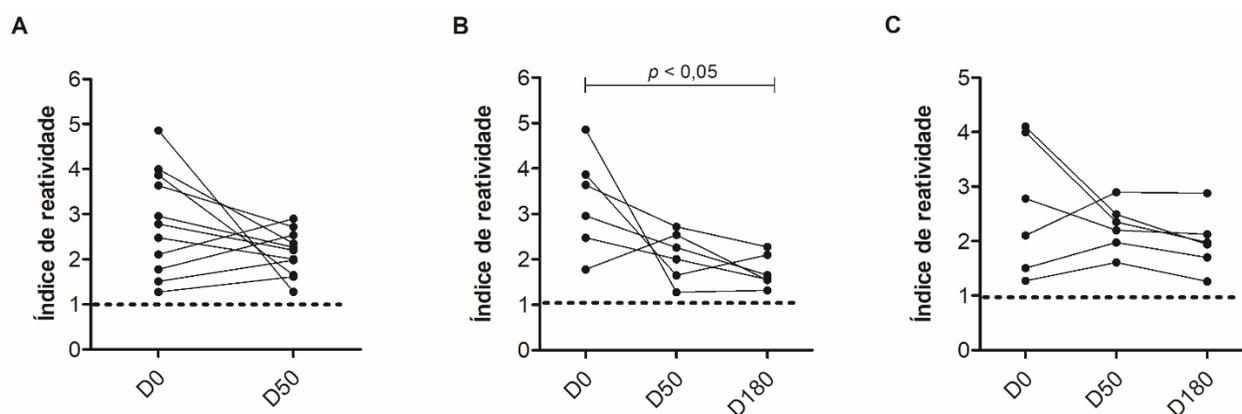


Figura 31. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra o antígeno PVX_119 de *Plasmodium vivax*. A) Índices de reatividade durante a fase aguda e convalescência nos dias D0 e D50 ($n = 6$), B) Índices de reatividade em D0, D50 e D180 entre os indivíduos sem recorrência de malária entre D50 e D180, C) Índices de reatividade em D0, D50 e D180 em indivíduos com recorrência. A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR.

O antígeno PVX_009 também apresentou um padrão de resposta semelhante. A frequência de anticorpos IgG contra cada um dos candidatos em D0 foi de 91,6%, mas não houve uma redução significativa nos anticorpos IgG específicos contra essa proteína tanto em D50 quanto D180. Ressaltando o seu potencial antigênico e uma possível capacidade de manutenção da resposta imune ao longo do tempo (Figura 32).

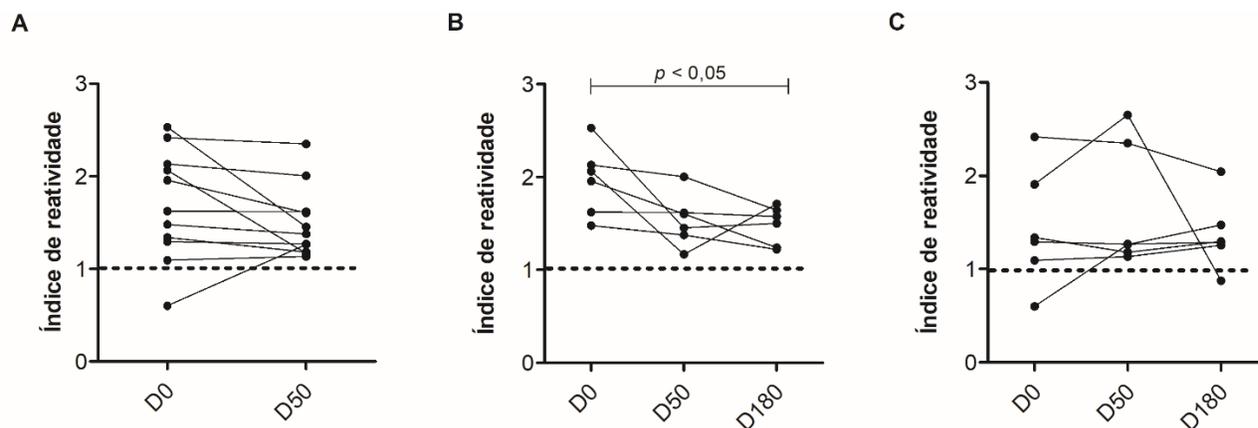


Figura 32. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra o antígeno PVX_009 de *Plasmodium vivax*. A) Índices de reatividade durante a fase aguda e convalescência nos dias D0 e D50 ($n = 6$), B) Índices de reatividade em D0, D50 e D180 entre os indivíduos sem recorrência de malária entre D50 e D180, C) Índices de reatividade em D0, D50 e D180 em indivíduos com recorrência. A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR.

Por fim, o antígeno PVX_111 mostrou uma frequência de reatividade positiva de 58,33% em D0. Pouco mais da metade dos indivíduos possuem anticorpos antígeno específicos contra PVX_111 em D0, porém a frequência foi menor comparada aos outros candidatos. Além disso, observou-se uma queda contínua até D180. Em D180 sem parasitemia apenas um indivíduo teve resposta *borderline* positiva e entre os indivíduos assintomáticos apenas dois mantiveram resposta de IgG contra o antígeno (Figura 33).

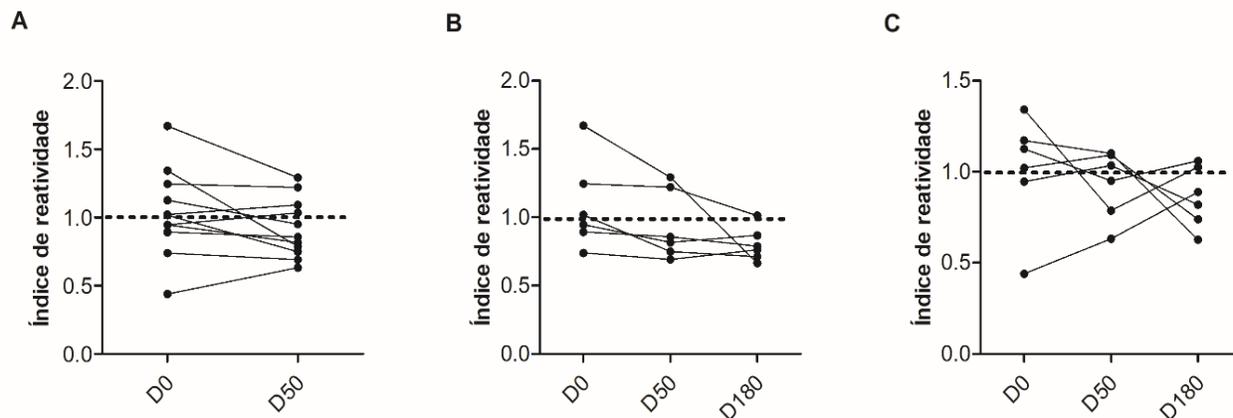


Figura 33. Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquirida contra o antígeno PVX_111 de *Plasmodium vivax*. A) Índices de reatividade durante a fase aguda e convalescência nos dias D0 e D50 (n = 6), B) Índices de reatividade em D0, D50 e D180 entre os indivíduos sem recorrência de malária entre D50 e D180, C) Índices de reatividade em D0, D50 e D180 em indivíduos com recorrência. A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR.

O antígeno PVX_119 apresentou 100% de resposta positiva de anticorpos IgG nos três pontos analisados e a maior média de reatividade em comparação aos demais candidatos. Em D0, teve IR médio significativamente maior que todos os outros candidatos (Figura 34A). Em D50 e D180, foi visto que a reatividade de PVX_119 foi significativamente elevada em relação a PVX_111 (Figura 34B). Além disso, em D50 e D180 os antígenos PVX_089 e PVX_009 tiveram reatividade significativamente mais alta que PVX_111 (Figura 34C).

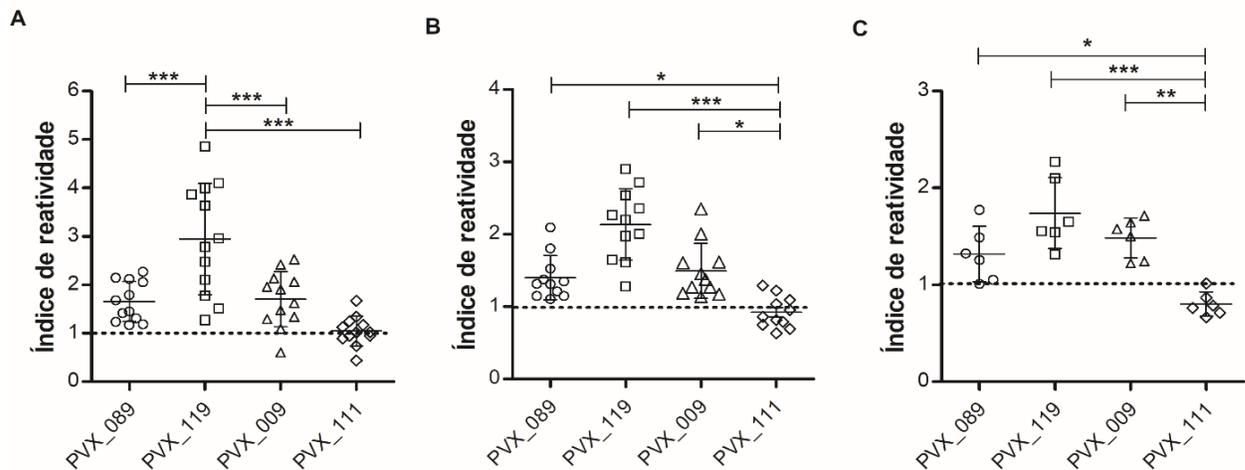


Figura 34. Comparação entre os índices de reatividade de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra as proteínas PVX_089, PVX_119, PVX_009 e PVX_111 de *P. vivax* nos dias D0, D50 e D180. A) Análise comparativa entre as respostas de IgG no D0 (n = 12), B) Análise comparativa entre as respostas de IgG no D50 (n = 11), C) Análise comparativa entre as respostas de IgG no D180 sem recorrência (n = 6). A linha horizontal tracejada mostra o limiar de positividade do IR. A média de cada grupo foi indicada pela linha horizontal \pm DP. Diferenças estatisticamente significativas são representadas nos gráficos por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

A malária é um problema de saúde pública global. No Brasil, a maioria dos casos é de malária vivax. Diante dos registros que mostram que a malária vivax pode gerar complicações (ALEXANDRE; FERREIRA; SIQUEIRA; MAGALHÃES *et al.*, 2010) e das evidências de que *P. vivax* é menos suscetível às ações de controle e erradicação devido às suas especificidades, comparado ao *P. falciparum* (MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015), evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de uma vacina direcionada a esta espécie.

Alguns dos antígenos mais estudados na busca por uma vacina são: MSP-1 e AMA1, ambos de fase eritrocítica, associados à invasão das hemácias e evasão imunológica (CORNEJO; FISHER; ESCALANTE, 2014; DIEZ BENAVENTE; WARD; CHAN; MOHAREB *et al.*, 2017; PEARSON; AMATO; AUBURN; MIOTTO *et al.*, 2016). Esses antígenos são conhecidos pela capacidade de induzir resposta imune naturalmente adquirida e em alguns casos gerar imunidade clínica (DODOO; AIKINS; KUSI; LAMPTEY *et al.*, 2008; O'FLAHERTY; ROE; FOWKES, 2022). No entanto, apesar do potencial vacinal, são codificadas por genes altamente polimórficos, o que é um limitante na geração da resposta imune que conduza a uma ampla proteção.

No capítulo 1 foi avaliada a diversidade genética do antígeno PvAMA1 em isolados de campo e foram evidenciados 19 haplótipos. Destes, foram selecionados dois: um encontrado com alta frequência (PvAMA1H5) (22,5%) e outro com baixa frequência (PvAMA1H16) (2,5%). Em seguida, avaliou-se a resposta imune de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra as duas variantes correspondentes a estes haplótipos (PvAMA1V5 e PvAMA1V16), para verificar se os polimorfismos causam alguma influência na geração de resposta imune. Diante dos resultados obtidos e buscando uma caracterização da resposta imune e a longevidade dos anticorpos IgM e IgG naturalmente adquiridos, foi realizado um segundo estudo, descrito no capítulo 2.

Neste estudo, participantes adultos, residentes de áreas endêmicas no estado do Amazonas, expostos à infecção por malária vivax, sem evidência de infecção por malária nos últimos seis meses, foram avaliados na fase aguda e nos segmentos D50 e

D180. Durante a infecção, foram detectadas alterações nos níveis de plaquetas, hemoglobina, leucócitos e linfócitos totais.

A plaquetopenia é a alteração hematológica mais comum na malária, com uma frequência de aproximadamente 80% nos casos de malária falciparum e vivax (SCOTT; VAN ZYL; HO; RUIVO *et al.*, 2002). Não se sabe ao certo os mecanismos responsáveis pela plaquetopenia, mas acredita-se que seja multifatorial. Alguns mecanismos propostos são: destruição plaquetária mediada por anticorpos, distúrbios da coagulação, esplenomegalia, alterações da medula óssea e estresse oxidativo (LACERDA; MOURÃO; COELHO; SANTOS, 2011). Na população analisada, 92% dos participantes apresentaram plaquetopenia durante a fase aguda da doença, dentre eles 8% apresentaram plaquetopenia grave. No entanto, após o tratamento, esses níveis normalizaram, conforme os estudos que mostram que essa condição é revertida após o tratamento da malária (HORSTMANN; DIETRICH; BIENZLE; RASCHE, 1981; LACERDA; MOURAO; ALEXANDRE; SIQUEIRA *et al.*, 2012).

Em relação aos níveis de hemoglobina, 32% dos indivíduos estavam anêmicos durante a infecção, porém, 50 dias depois todos tiveram os níveis de hemoglobina reestabelecidos. A anemia é uma das formas clínicas de apresentação da malária. A infecção por *Plasmodium* spp. causa hemólise de eritrócitos infectados e não infectados e o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias que causam um efeito inibitório da eritropoese (deseritropoese) (CLARK; BUDD; ALLEVA; COWDEN, 2006; WHITE, 2018).

Outra alteração comum durante a malária é a redução nas contagens de leucócitos, fenômeno chamado leucopenia (KINI; CHANDRASHEKHAR, 2016; KOTEPUI; PHUNPHUECH; PHIWKLAM; CHUPEERACH *et al.*, 2014; MCKENZIE; PRUDHOMME; MAGILL; FORNEY *et al.*, 2005), porém, também existem relatos de aumento dos leucócitos (leucocitose), que está relacionada a casos de malária grave, anemia e, em crianças, foi associada à mortalidade (LADHANI; LOWE; COLE; KOWUONDO *et al.*, 2002; MODIANO; SIRIMA; KONATÉ; SANOU *et al.*, 2001). Neste estudo, 44% dos indivíduos com malária vivax estavam leucopênicos em D0 e reestabeleceram os níveis de leucócitos em D50.

Por fim, observou-se que 92% dos pacientes infectados estavam linfopênicos, mas esses números foram normalizados após tratamento (D50). A ocorrência de linfopenia é comumente observada na malária vivax e falciparum (TANGPUKDEE; YEW; KRUDSOOD; PUNYAPRADIT *et al.*, 2008). A infecção aguda causa uma depleção das populações de linfócitos no sangue periférico, a extensão da redução e o tipo de células alteradas diferem de acordo com as localizações geográficas. Isso pode ser devido às diferenças no estado imunológico dos indivíduos, no nível de endemicidade da malária, ou a diferença nas cepas do parasito (KASSA; PETROS; MESELE; HAILU *et al.*, 2006). Existem basicamente duas hipóteses que explicam o mecanismo dessa depleção: sequestro de células nos gânglios linfáticos ou outras partes do corpo, seguido de reemergência destas células após a cura da doença (HVIID; KEMP, 2000; KASSA; PETROS; MESELE; HAILU *et al.*, 2006) e/ou morte por apoptose (HELMBY; JÖNSSON; TROYE-BLOMBERG, 2000; HVIID; KEMP, 2000; KASSA; PETROS; MESELE; HAILU *et al.*, 2006; TOURE-BALDE; SARTHOU; ARIBOT; MICHEL *et al.*, 1996).

O controle da malária é multifatorial e ocorre por meio de uma ação sinérgica entre anticorpos e mecanismos efetores mediados por células para a obtenção de uma resposta antiparasitária que leve à imunidade clínica (NOGARO; HAFALLA; WALTHER; REMARQUE *et al.*, 2011). No que se refere à resposta imune durante o estágio sanguíneo, destaca-se a resposta de anticorpos, que exercem diversas funções como a inibição da invasão dos merozoítos nos eritrócitos, prevenção da adesão dos eritrócitos parasitados aos tecidos e opsonização dos merozoítos e eritrócitos parasitados. Estudos mostram que o nível da resposta de anticorpos e o número de antígenos reconhecidos são críticos para a geração de imunidade humoral protetora (HAMRE; ONDIGO; HODGES; DUTTA *et al.*, 2020; OSIER; FEGAN; POLLEY; MURUNGI *et al.*, 2008). Por isso, neste estudo foram avaliadas a geração e a persistência de anticorpos IgG e IgM contra os antígenos PvAMA1V5 e PvAMA1V16.

Em relação à longevidade da resposta imune de anticorpos IgM, os dados são escassos e um pouco contraditórios. Estudos mostram que nos primeiros dias da infecção ocorre uma forte resposta de anticorpos IgM. No entanto, alguns relatam que essa resposta é de curta duração (WALKER; KNUDSEN; PARTEY; BASSI *et al.*, 2020) e outros, duradoura (BOYLE; CHAN; HANDAYUNI; REILING *et al.*, 2019; PATGAONKAR;

HERBERT; POWALE; GANDHE *et al.*, 2018). No presente estudo, os níveis de anticorpos IgM encontravam-se elevados na fase aguda, mas caíram drasticamente após a infecção, visualizando-se poucas amostras positivas. Na análise comparativa entre as respostas anti-PvAMA1V5 e anti-PvAMA1V16, foi visto que a reatividade foi maior contra a segunda proteína em relação à primeira.

No que tange a resposta de anticorpos IgG, foi evidenciado que para PvAMA1V5 a frequência de positivos foi maior em D50, mas o índice de reatividade foi significativamente maior na fase aguda em relação a convalescença e para PvAMA1V16 não houve diferença significativa entre as respostas na fase aguda e convalescença. Nas análises entre os três segmentos, no grupo que foi exposto à malária apenas no D0, não foi visto uma diferença nos níveis de anticorpos, apesar de ter sido observado um declínio na reatividade entre D0 e D180. Esses dados mostram a capacidade de manutenção da resposta imune naturalmente adquirida durante o tempo e corroboram com os resultados apresentados no capítulo 1. Na análise comparativa entre as respostas de IgG contra cada variante, não houve diferença significativa entre elas em nenhum dos pontos avaliados, ao contrário do que foi visto no capítulo 1. Porém, devemos lembrar que as amostras analisadas em cada estudo foram coletadas com um intervalo de 6 a 7 anos de diferença. Além disso, o grupo amostral do capítulo 2 foi recrutado seguindo critérios de exclusão mais rígidos, por exemplo, só foram incluídos indivíduos que não tiveram malária há, pelo menos, 6 meses antes deste episódio de malária vivax (D0).

Alguns indivíduos tiveram um novo episódio de malária em algum momento entre os segmentos. No D50, 3 indivíduos tiveram resultado positivo para a malária vivax no momento da coleta, sem apresentarem sintomas. No D180, 6 dos 12 voluntários tiveram um episódio de malária nesse período de 130 dias entre a segunda e a última coleta, sendo 3 deles assintomáticos no D180. Surpreendentemente, um dos indivíduos assintomáticos no D50 permaneceu com infecção assintomática no D180. Infecções que ocorrem sem o aparecimento de sintomas são chamadas de infecções subclínicas ou assintomáticas. As infecções assintomáticas são caracterizadas por níveis altos de anticorpos e são mais comuns em populações que vivem em regiões endêmicas com alta exposição à malária. Apesar de existirem lacunas e incertezas no entendimento das

infecções assintomáticas, a persistência de infecções subclínicas está geralmente relacionada às exposições frequentes ao parasita e à aquisição de imunidade não esterilizante, que controla a densidade do parasita abaixo de um limiar clínico e acredita-se que essa infecção crônica em populações constantemente expostas seja mantida pela imunidade adquirida (O'FLAHERTY; ROE; FOWKES, 2022). Ao analisar o perfil de reatividade de anticorpos IgG em D0, D50 e D180 nos indivíduos sem e com recorrência de malária, foi visto que apesar de não haver diferença significativa entre os segmentos, quando apenas as reatividades do ponto D180 foram analisadas, os indivíduos com recorrência possuíam índice de reatividade aumentado em relação ao grupo sem recorrência. Esse aumento da resposta imune pode ter levado alguns dos indivíduos a uma proteção clínica após reexposição.

De maneira geral, parte dos resultados obtidos no capítulo 2 assemelham-se com os resultados do capítulo 1. Evidencia-se a capacidade antigênica de ambas as variantes, confirma-se a capacidade de gerarem resposta duradoura nos 50 dias após infecção. No entanto, os resultados do capítulo 2 nos mostram que a população que foi acompanhada durante 6 meses teve uma queda nos anticorpos durante esse período. Essa redução não ocorreu quando os indivíduos foram reexpostos à malária, pelo contrário, a prevalência de anticorpos chegou a 100% após recorrência. No capítulo 1, vimos uma alta frequência de anticorpos nos indivíduos não infectados, que pode ser explicada pela região de alta incidência de malária na qual os participantes do estudo residiam e pela falta de informação e controle sobre infecções prévias.

Não existe um consenso sobre a longevidade das respostas humorais durante a malária. Além disso, existem divergências em relação aos perfis de células B durante e após a exposição à malária, provavelmente devido às especificidades inerentes dos indivíduos provenientes de áreas geográficas distintas. Neste estudo, foi visto uma diminuição das células B totais na fase aguda da doença. Esses dados são consistentes com achados anteriores em estudos com *P. falciparum* (ASITO; MOORMANN; KIPROTICH; NG'ANG'A *et al.*, 2008). A redução de células B totais pode ser explicada pela realocação temporária de linfócitos da circulação periférica para os tecidos ou órgãos linfoides após a infecção, ou pode ocorrer pelo mecanismo de evasão do

Plasmodium após a interrupção da linfopoiese de células B e a indução de apoptose de células B conforme visto em modelo murino (MIN; CHANGROB; SOE; HAN *et al.*, 2017).

Nas análises entre D0 e D50 não foram vistas alterações nas populações de células B atípicas, mas quando avaliamos os indivíduos que foram reexpostos à malária foi visto um aumento significativo em D180. Isso mostra que a reexposição influenciou no aumento desta população, corroborando os resultados que dizem que a frequência de MBC atípicas é elevada em relação aos indivíduos primoinfectados (SOARES; CUNHA; FERRAZ-NOGUEIRA; MARINS-DOS-SANTOS *et al.*, 2019) e esse aumento tem correlação positiva com o número de exposições (WEISS; CROMPTON; LI; WALSH *et al.*, 2009), além de ter sido relacionado com o aumento da imunidade contra a malária em crianças (SULLIVAN; SSEWANYANA; WAMALA; NANKYA *et al.*, 2016).

O aumento de MBC atípicas é uma das alterações mais reportadas na malária tanto em pacientes infectados por *P. falciparum* (ILLINGWORTH; BUTLER; ROETYNCK; MWACHARO *et al.*, 2013; SULLIVAN; SSEWANYANA; WAMALA; NANKYA *et al.*, 2016; WEISS; CROMPTON; LI; WALSH *et al.*, 2009), quanto em infecções por *P. vivax* (FIGUEIREDO; COSTA; DINIZ; HENRIQUES *et al.*, 2017; KOCHAYOO; CHANGROB; WANGRIATISAK; LEE *et al.*, 2019). O aumento das células de memória atípicas está relacionado com o aumento da idade e da exposição ao parasito (SULLIVAN; SSEWANYANA; WAMALA; NANKYA *et al.*, 2016; WEISS; CROMPTON; LI; WALSH *et al.*, 2009). Existem relatos divergentes sobre a capacidade efetora de MBC atípicas de indivíduos com malária. Alguns defendem que as células de memória atípicas são capazes de secretar anticorpos neutralizantes (MUELLENBECK; UEBERHEIDE; AMULIC; EPP *et al.*, 2013), enquanto outros afirmam as células B atípicas têm menor capacidade de serem estimuladas a proliferarem, secretarem citocinas ou produzirem anticorpos (PORTUGAL; OBENG-ADJEI; MOIR; CROMPTON *et al.*, 2017).

Durante a fase aguda da malária a população de plasmócitos estava aumentada, o que corrobora com estudos que mostram que infecções agudas induzidas por *P. falciparum* e *P. vivax* (PATGAONKAR; HERBERT; POWALE; GANDHE *et al.*, 2018) estão associadas à expansão de plasmócitos, os quais são conhecidos pela capacidade de secretar anticorpos prontamente. Tais células circulam no sangue

periférico por um curto período (NDUATI; NG; NDUNGU; GARDNER *et al.*, 2010) e retornam aos níveis fisiológicos após o tratamento da doença (CLARK; SILVA; WEISS; LI *et al.*, 2012; PATGAONKAR; HERBERT; POWALE; GANDHE *et al.*, 2018).

Foi visto uma redução na população de células B imaturas após a infecção. No entanto, estudos observaram um aumento em de células imaturas em crianças após infecção por *P. falciparum* (ASITO; MOORMANN; KIPROTICH; NG'ANG'A *et al.*, 2008; SULLIVAN; SSEWANYANA; WAMALA; NANKYA *et al.*, 2016). Além disso, observou-se uma correlação positiva com a parasitemia (SULLIVAN; SSEWANYANA; WAMALA; NANKYA *et al.*, 2016). Mais estudos são necessários para determinar o padrão de alteração nesta população e durante e após a malária.

Por fim, nas comparações entre os dias D0 e D50 foi visto uma redução significativa nas células B naive em D0, esse mesmo padrão foi visto anteriormente tanto em infecções por *P. vivax* (PATGAONKAR; HERBERT; POWALE; GANDHE *et al.*, 2018) quanto *P. falciparum* (ASITO; MOORMANN; KIPROTICH; NG'ANG'A *et al.*, 2008). Acredita-se que as reduções observadas nas proporções de células B naive circulantes podem ser resultado do aumento nas proporções de células B imaturas (SULLIVAN; SSEWANYANA; WAMALA; NANKYA *et al.*, 2016).

Para avaliar se houve alguma relação entre a resposta de anticorpos IgG e IgM contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 e as frequências de células B, os subtipos de células B em indivíduos com e sem anticorpos naturalmente adquiridos contra as proteínas PvAMA1 foram comparados. Foi visto um aumento na população de células B totais em indivíduos IgG e IgM positivos em D0 e um aumento nas MBC atípicas em indivíduos IgM positivo, após tratamento (D50). Apesar de ter sido evidenciadas essas alterações, não é possível afirmar que existe uma relação direta entre alterações nas populações de células B e a produção de anticorpos antígeno-específicos, uma vez que não foram realizadas análises das células B de memória frente aos antígenos. Apesar de ter sido avaliado o perfil de células B na população, estudos adicionais com análises de ELISpot (*enzyme-linked immunospot assay*) são necessários para detectar e caracterizar a produção de anticorpos antígeno-específicos pelas células B de memória.

Por muito tempo a resposta imune de memória contra *P. vivax* esteve praticamente inexplorada. Porém nos últimos anos foram publicados vários estudos que visam caracterizar a resposta de memória específica contra os antígenos de *P. vivax* (KOCHAYOO; CHANGROB; WANGRIATISAK; LEE et al., 2019; KOCHAYOO; KITTISENACHAI; CHANGROB; WANGRIATISAK et al., 2019; KOCHAYOO; SANGUANSUTTIKUL; THAWORN PAN; WANGRIATISAK et al., 2021; MIN; CHANGROB; SOE; HAN et al., 2017; SOARES; CUNHA; FERRAZ-NOGUEIRA; MARINS-DOS-SANTOS et al., 2019). No entanto, poucos estudos caracterizaram a memória imunológica contra PvAMA1. Um dos estudos avaliou um peptídeo de PvAMA1, denominado PvAMA-1(S290-K307) e foi visto que houve resposta duradora de anticorpos e de células B de memória contra esse epítipo na ausência de reinfeção. No entanto, não foi evidenciada correlação positiva entre as células de memória e os níveis de anticorpos antígeno específicos ao longo do tempo (SOARES; CUNHA; FERRAZ-NOGUEIRA; MARINS-DOS-SANTOS et al., 2019).

Apesar da grande importância para a saúde pública, o desenvolvimento de uma vacina contra a malária vivax tem sido lento, com poucos candidatos em fase pré-clínica ou clínica de desenvolvimento e frequentemente orientado por estudos focados em *P. falciparum* devido à dificuldade em trabalhar com o *P. vivax* in vitro. O advento da era do genoma trouxe novas alternativas para a descoberta de vacinas e fármacos utilizando ferramentas de bioinformática. O genoma de *P. vivax* é codificado por mais de 5000 genes (AURRECOECHEA et al., 2009). Hoje sabe-se que os dados obtidos através do sequenciamento genômico somado ao uso da imunoinformática podem acelerar significativamente a identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento de novas vacinas.

A abordagem da vacinologia reversa utiliza informações do genoma do organismo alvo para identificar potenciais antígenos vacinais sem a necessidade do cultivo do patógeno in vitro. A vacinologia reversa já foi utilizada na descoberta de antígenos vacinais de diversas doenças (ARIEL; ZVI; GROSFELD; GAT et al., 2002; BETTS, 2002; DE OLIVEIRA LOPES; DE OLIVEIRA; DO VALE COELHO; DE OLIVEIRA SANTANA et al., 2013; JOHN; JOHN; KHOLIA, 2012; WIZEMANN; HEINRICH; S;

ADAMOU; ERWIN *et al.*, 2001; XIANG; HE, 2013). Na pesquisa de vacinas contra a malária essa abordagem é uma alternativa para superar as limitações impostas pela biologia do *P. vivax* e já mostrou-se eficaz na detecção de alvos para vacinas para a malária. Resultados obtidos nas análises experimentais corroboram com as previsões *in silico*, portanto, isso comprova que essa é uma ferramenta promissora capaz de promover uma seleção rápida e eficiente de novos alvos em potencial (AGAK; BEJON; FEGAN; GICHERU *et al.*, 2008; BUENO; LOBO; MORAIS; MOURÃO *et al.*, 2011; CRAVO; MACHADO; LEITE; LEDA *et al.*, 2018; VILLARD; AGAK; FRANK; JAFARSHAD *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foram selecionadas quatro sequências gênicas de *Plasmodium vivax*: PVX_089, PVX_111, PVX_009, PVX119, que codificam proteínas hipotéticas ou putativas com pouca ou nenhuma caracterização e com função desconhecida. Todos os candidatos possuem gene ortólogo em *P. falciparum*, exceto PVX_089. As proteínas foram expressas na superfície de células de mamífero e uma avaliação inicial foi feita para verificar o potencial antigênico de cada uma delas.

O gene PVX_089 faz parte da família Pv-fam-e (CARLTON; ADAMS; SILVA; BIDWELL *et al.*, 2008) e não possui ortólogos descritos em *P. falciparum* e em *P. berghei*. A proteína é expressa na fase eritrocítica e foi descrita anteriormente como altamente imunogênica (CHEN; CHEN; WANG; JU *et al.*, 2015). Além disso, foi verificado um score alto de adesividade em análises *in silico* utilizando o preditor MAAP (ANSARI; KUMAR; BALA SUBRAMANYAM; GNANAMANI *et al.*, 2008), portanto, foi considerada uma provável adesina (CHEN; CHEN; WANG; JU *et al.*, 2015). No presente estudo observou-se uma resposta de IgG duradoura contra essa proteína, onde todos os indivíduos avaliados no D180 mantiveram-se positivos, apesar da redução significativa no IR ao longo tempo.

Em relação ao antígeno PVX_111, chamado *Merozoite capping protein*, sua localização e função são um pouco controversas. Primeiramente, foi descrita como uma proteína de fase eritrocítica de *P. falciparum* localizada na extremidade apical do parasita que migra ao redor da superfície do merozoíto à medida que ocorre a invasão, sugerindo seu envolvimento no processo de invasão do parasita ao eritrócito (KLOTZ; HADLEY;

AIKAWA; LEECH *et al.*, 1989; MORENO-PÉREZ; DÉGANO; IBARROLA; MURO *et al.*, 2015). Além disso, foi visto que o gene UIS16, que codifica o ortólogo desta proteína em *P. berghei* é expresso tanto em esporozoítos, nas glândulas salivares, quanto em esquizontes, no estágio do sanguíneo (MATUSCHEWSKI; ROSS; BROWN; KAISER *et al.*, 2002).

Acredita-se que esta proteína possa estar desempenhando um papel semelhante durante a invasão dos eritrócitos por merozoítos bem como na invasão de hepatócitos por esporozoítos, sendo um potencial candidato a uma vacina multiestágio (CURTIDOR; GARCÍA; VANEGAS; PUENTES *et al.*, 2008). No entanto, em um outro estudo, também em *P. falciparum*, os dados apresentados vão de encontro aos primeiros. Neste trabalho afirma-se que esta proteína é uma peroxirredoxina, nomeada PfnPrx com localização estritamente nuclear e exerce um papel de proteção do material nuclear do parasita (RICHARD; BARTFAI; VOLZ; RALPH *et al.*, 2011). Em nossas análises esse foi o candidato que apresentou menor capacidade antigênica. No D0, a frequência de respondedores foi de 56%, mas a queda nos índices de reatividade ao longo do tempo foi grande e em D180 observou-se apenas dois respondedores limítrofes. Portanto, a partir dessa análise inicial, este foi o candidato com menor potencial.

O gene PVX_009, conhecido como *Liver-specific protein 2* foi primeiramente caracterizado em *P. berghei* ANKA. Conhecido como *lisp2*, é um gene que codifica uma proteína expressa somente durante o estágio hepático, em trofozoítos maduros e tardios e abundante expressão em esquizontes, sendo posteriormente exportada para o citoplasma e núcleo dos hepatócitos. Esta proteína pode estar envolvida nas interações parasita-hospedeiro necessárias para o desenvolvimento de parasitas no estágio hepático (ORITO; ISHINO; IWANAGA; KANEKO *et al.*, 2013).

Foi visto que em *P. cynomolgi* e *P. vivax* a sua expressão inicia a partir do terceiro dia após infecção, seguido de um aumento crescente do nível de expressão. Encontra-se de forma mais abundante em esquizontes, porém também está presente em trofozoítos e hipnozoítos (GUPTA; DEMBELE; VOORBERG-VAN DER WEL; ROMA *et al.*, 2019; GURAL; MANCIO-SILVA; MILLER; GALSTIAN *et al.*, 2018). Devido a este padrão de expressão, pode ser utilizada como marcador molecular do desenvolvimento

inicial do estágio hepático e auxiliar na descoberta de novas estratégias de controle da recaída da doença (GUPTA; DEMBELE; VOORBERG-VAN DER WEL; ROMA *et al.*, 2019). No presente estudo, esta proteína se mostrou antigênica e a reatividade de anticorpos IgG se manteve ao longo do tempo, apesar de ter sido evidenciada uma queda significativa entre D0 e D180.

O antígeno PVX_119 é o único que não possui quaisquer caracterização e função descritas até o momento, porém, dentre os quatro candidatos selecionados, este foi o que mostrou maior antigenicidade tanto durante a infecção quanto nos D50 e D180. Portanto, após essa caracterização inicial se mostrou um dos candidatos mais promissores.

As análises referentes à antigenicidade dos antígenos selecionados por análises *in silico* tratam-se de uma triagem inicial para compreendermos o potencial de cada antígeno. Optou-se por realizar a expressão das proteínas recombinantes em sistema heterólogo eucarioto devido às dificuldades associadas à expressão de proteínas solúveis de *Plasmodium* em bactérias e o tempo despendido para a expressão de quatro proteínas. Foram analisados os plasmas dos indivíduos que compareceram nos três dias de coleta, portanto, o n amostral dessas análises foi limitado. Para a avaliação mais ampla da resposta imune humoral contra estes antígenos, é necessária a avaliação de uma população maior. No entanto, apesar dessa limitação em relação ao tamanho do grupo amostral, essas análises iniciais indicam os antígenos com maior potencial e, a partir disso, serão realizadas a expressão de proteínas em larga escala e as análises complementares para caracterização da resposta de imune de memória.

7 CONCLUSÃO

- As variantes PvAMA1V5 e PvAMA1V16 são antigênicas e geram resposta de anticorpos IgM na fase aguda, porém, esta resposta não foi duradoura;
- A resposta de anticorpos IgG contra PvAMA1V5 e PvAMA1V16 foi duradoura em populações de áreas endêmicas distintas.
- Na fase aguda da malária ocorre uma redução na população de linfócitos B totais e um aumento de células B naive, células B imaturas e plasmócitos.
- As proteínas PVX_089, PVX_111, PVX_009, PVX_119 são antigênicas e geram resposta de anticorpos IgG duradoura.

8 REFERÊNCIAS

AASHISH, A.; MANIGANDAN, G. Complicated vivax malaria, an often underestimated condition - Case Report. **J Family Community Med**, 22, n. 3, p. 180-182, 2015 Sep-Dec 2015.

AGAK, G. W.; BEJON, P.; FEGAN, G.; GICHERU, N. *et al.* Longitudinal analyses of immune responses to Plasmodium falciparum derived peptides corresponding to novel blood stage antigens in coastal Kenya. **Vaccine**, 26, n. 16, p. 1963-1971, Apr 07 2008.

AGNANDJI, S. T.; LELL, B.; FERNANDES, J. F.; ABOSSOLO, B. P. *et al.* A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. **N Engl J Med**, 367, n. 24, p. 2284-2295, Dec 13 2012.

AKPOGHENETA, O. J.; DUAH, N. O.; TETTEH, K. K.; DUNYO, S. *et al.* Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific. **Infect Immun**, 76, n. 4, p. 1748-1755, Apr 2008.

AKTER, J.; KHOURY, D. S.; AOGO, R.; LANSINK, L. I. M. *et al.* Plasmodium-specific antibodies block in vivo parasite growth without clearing infected red blood cells. **PLoS Pathog**, 15, n. 2, p. e1007599, 02 2019.

ALEXANDRE, M. A.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L. *et al.* Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, 16, n. 10, p. 1611-1614, Oct 2010.

ALVES, E.; SALMAN, A. M.; LEORATTI, F.; LOPEZ-CAMACHO, C. *et al.* Evaluation of Plasmodium vivax Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites as a Preerythrocytic P. vivax Vaccine. **Clin Vaccine Immunol**, 24, n. 4, Apr 2017.

AMPOMAH, P.; STEVENSON, L.; OFORI, M. F.; BARFOD, L. *et al.* B-cell responses to pregnancy-restricted and -unrestricted Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 antigens in Ghanaian women naturally exposed to malaria parasites. **Infect Immun**, 82, n. 5, p. 1860-1871, May 2014.

ANSARI, F. A.; KUMAR, N.; BALA SUBRAMANYAM, M.; GNANAMANI, M. *et al.* MAAP: malarial adhesins and adhesin-like proteins predictor. **Proteins**, 70, n. 3, p. 659-666, Feb 2008.

ANTONELLI, L. R.; JUNQUEIRA, C.; VINETZ, J. M.; GOLENBOCK, D. T. *et al.* The immunology of Plasmodium vivax malaria. **Immunol Rev**, 293, n. 1, p. 163-189, Jan 2020.

ARÉVALO-HERRERA, M.; GAITÁN, X.; LARMAT-DELGADO, M.; CAICEDO, M. A. *et al.* Randomized clinical trial to assess the protective efficacy of a Plasmodium vivax CS synthetic vaccine. **Nat Commun**, 13, n. 1, p. 1603, Mar 25 2022.

ASITO, A. S.; MOORMANN, A. M.; KIPROTICH, C.; NG'ANG'A, Z. W. *et al.* Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. **Malar J**, 7, p. 238, Nov 18 2008.

BAHRAMI, A. A.; PAYANDEH, Z.; KHALILI, S.; ZAKERI, A. *et al.* Immunoinformatics. **Int Rev Immunol**, p. 1-16, Sep 2019.

BAIRD, J. K. Chloroquine resistance in Plasmodium vivax. **Antimicrob Agents Chemother**, 48, n. 11, p. 4075-4083, Nov 2004.

BAIRD, J. K.; JONES, T. R.; DANUDIRGO, E. W.; ANNIS, B. A. *et al.* Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria. **Am J Trop Med Hyg**, 45, n. 1, p. 65-76, Jul 1991.

BAIRD, K. J.; MAGUIRE, J. D.; PRICE, R. N. Diagnosis and treatment of Plasmodium vivax malaria. **Adv Parasitol**, 80, p. 203-270, 2012.

BAUZA, K.; MALINAUSKAS, T.; PFANDER, C.; ANAR, B. *et al.* Efficacy of a Plasmodium vivax malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia Ankara expressing thrombospondin-related anonymous protein as assessed with transgenic Plasmodium berghei parasites. **Infect Immun**, 82, n. 3, p. 1277-1286, Mar 2014.

BEESON, J. G.; DREW, D. R.; BOYLE, M. J.; FENG, G. *et al.* Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. **FEMS Microbiol Rev**, 40, n. 3, p. 343-372, 05 2016.

BEESON, J. G.; KURTOVIC, L.; DOBAÑO, C.; OPI, D. H. *et al.* Challenges and strategies for developing efficacious and long-lasting malaria vaccines. **Sci Transl Med**, 11, n. 474, Jan 2019.

BEESON, J. G.; OSIER, F. H.; ENGWERDA, C. R. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. **Trends Parasitol**, 24, n. 12, p. 578-584, Dec 2008.

BENNETT, J. W.; YADAVA, A.; TOSH, D.; SATTABONGKOT, J. *et al.* Phase 1/2a Trial of Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 2, p. e0004423, Feb 2016.

BERGMANN-LEITNER, E. S.; LEGLER, P. M.; SAVRANSKAYA, T.; OCKENHOUSE, C. F. *et al.* Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CeTOS. **Vaccine**, 29, n. 35, p. 5940-5949, Aug 11 2011.

BERGMANN-LEITNER, E. S.; MEASE, R. M.; DE LA VEGA, P.; SAVRANSKAYA, T. *et al.* Immunization with pre-erythrocytic antigen CeTOS from Plasmodium falciparum elicits cross-species protection against heterologous challenge with Plasmodium berghei. **PLoS One**, 5, n. 8, p. e12294, Aug 19 2010.

BITTENCOURT, N. C.; LEITE, J. A.; SILVA, A. B. I. E.; PIMENTA, T. S. *et al.* Genetic sequence characterization and naturally acquired immune response to Plasmodium vivax Rhoptry Neck Protein 2 (PvRON2). **Malar J**, 17, n. 1, p. 401, Oct 2018.

BITTENCOURT, N. C.; SILVA, A. B. I. E.; VIRGILI, N. S.; SCHAPPO, A. P. *et al.* Plasmodium vivax AMA1: Implications of distinct haplotypes for immune response. **PLoS Negl Trop Dis**, 14, n. 7, p. e0008471, 07 2020.

BLAGBOROUGH, A. M.; MUSIYCHUK, K.; BI, H.; JONES, R. M. *et al.* Transmission blocking potency and immunogenicity of a plant-produced Pvs25-based subunit vaccine against Plasmodium vivax. **Vaccine**, 34, n. 28, p. 3252-3259, Jun 14 2016.

BLAGBOROUGH, A. M.; YOSHIDA, S.; SATTABONGKOT, J.; TSUBOI, T. *et al.* Intranasal and intramuscular immunization with Baculovirus Dual Expression System-based Pvs25 vaccine substantially blocks Plasmodium vivax transmission. **Vaccine**, 28, n. 37, p. 6014-6020, Aug 23 2010.

BOYLE, M. J.; CHAN, J. A.; HANDAYUNI, I.; REILING, L. *et al.* IgM in human immunity to. **Sci Adv**, 5, n. 9, p. eaax4489, Sep 2019.

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; DE PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M. *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**, 5, n. 10, p. e1038-e1046, 10 2017.

BUENO, L. L.; LOBO, F. P.; MORAIS, C. G.; MOURÃO, L. C. *et al.* Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). **PLoS One**, 6, n. 6, p. e21289, 2011.

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L. *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature**, 455, n. 7214, p. 757-763, Oct 2008.

CASTELLANOS, A.; ARÉVALO-HERRERA, M.; RESTREPO, N.; GULLOSO, L. *et al.* *Plasmodium vivax* thrombospondin related adhesion protein: immunogenicity and protective efficacy in rodents and Aotus monkeys. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102, n. 3, p. 411-416, Jun 2007.

CAVANAGH, D. R.; ELHASSAN, I. M.; ROPER, C.; ROBINSON, V. J. *et al.* A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. **J Immunol**, 161, n. 1, p. 347-359, Jul 01 1998.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, A. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. *et al.* *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 101, n. 10, p. 1042-1044, Oct 2007.

CHEN, J. H.; CHEN, S. B.; WANG, Y.; JU, C. *et al.* An immunomics approach for the analysis of natural antibody responses to *Plasmodium vivax* infection. **Mol Biosyst**, 11, n. 8, p. 2354-2363, Aug 2015.

CHENG, Y.; WANG, Y.; ITO, D.; KONG, D. H. *et al.* The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of *P. vivax*. **Infect Immun**, 81, n. 5, p. 1585-1595, May 2013.

CHITNIS, C. E. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. **Curr Opin Hematol**, 8, n. 2, p. 85-91, Mar 2001.

CLARK, E. H.; SILVA, C. J.; WEISS, G. E.; LI, S. *et al.* Plasmodium falciparum malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. **Infect Immun**, 80, n. 4, p. 1583-1592, Apr 2012.

CLARK, I. A.; BUDD, A. C.; ALLEVA, L. M.; COWDEN, W. B. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malar J**, 5, p. 85, Oct 10 2006.

COHEN, S.; BUTCHER, G. A.; CRANDALL, R. B. Action of malarial antibody in vitro. **Nature**, 223, n. 5204, p. 368-371, Jul 1969.

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

CORNEJO, O. E.; FISHER, D.; ESCALANTE, A. A. Genome-wide patterns of genetic polymorphism and signatures of selection in Plasmodium vivax. **Genome Biol Evol**, 7, n. 1, p. 106-119, Dec 17 2014.

COSTA, F. T.; LOPES, S. C.; ALBRECHT, L.; ATAIDE, R. *et al.* On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. **Int J Parasitol**, 42, n. 12, p. 1099-1105, Nov 2012.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, 167, n. 3, p. 610-624, Oct 2016.

COWMAN, A. F.; TONKIN, C. J.; THAM, W. H.; DURAISINGH, M. T. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. **Cell Host Microbe**, 22, n. 2, p. 232-245, Aug 09 2017.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasit Vectors**, 3, n. 1, p. 5, Feb 2010.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M.; LEE, K. S.; SHAMSUL, S. S. *et al.* Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clin Infect Dis**, 46, n. 2, p. 165-171, Jan 2008.

CRAVO, P.; MACHADO, R. B.; LEITE, J. A.; LEDA, T. *et al.* In silico epitope mapping and experimental evaluation of the Merozoite Adhesive Erythrocytic Binding Protein (MAEBL) as a malaria vaccine candidate. **Malar J**, 17, n. 1, p. 20, Jan 10 2018.

CREWETHER, P. E.; MATTHEW, M. L.; FLEGG, R. H.; ANDERS, R. F. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. **Infect Immun**, 64, n. 8, p. 3310-3317, Aug 1996.

CROMPTON, P. D.; MIRCETIC, M.; WEISS, G.; BAUGHMAN, A. *et al.* The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naive individuals. **J Immunol**, 182, n. 5, p. 3318-3326, Mar 2009.

CRUZ, L. A. B.; MORAES, M. O. A.; QUEIROGA-BARROS, M. R.; FUKUTANI, K. F. *et al.* Chronic hepatitis B virus infection drives changes in systemic immune activation profile in patients coinfecting with *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 6, p. e0007535, 06 2019.

CURTIDOR, H.; GARCÍA, J.; VANEGAS, M.; PUENTES, F. *et al.* Identification of peptides with high red blood cell and hepatocyte binding activity in the *Plasmodium falciparum* multi-stage invasion proteins: PfSPATR and MCP-1. **Biochimie**, 90, n. 11-12, p. 1750-1759, 2008.

DA VEIGA, G. T. S.; MORIGGI, M. R.; VETTORAZZI, J. F.; MÜLLER-SANTOS, M. *et al.* vaccine: What is the best way to go? **Front Immunol**, 13, p. 910236, 2022.

DARKO, C. A.; ANGOV, E.; COLLINS, W. E.; BERGMANN-LEITNER, E. S. *et al.* The clinical-grade 42-kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* strain FVO expressed in *Escherichia coli* protects *Aotus nancymai* against challenge with homologous erythrocytic-stage parasites. **Infect Immun**, 73, n. 1, p. 287-297, Jan 2005.

DATOO, M. S.; NATAMA, M. H.; SOMÉ, A.; TRAORÉ, O. *et al.* Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. **Lancet**, 397, n. 10287, p. 1809-1818, 05 15 2021.

DAYANANDA, K. K.; ACHUR, R. N.; GOWDA, D. C. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of. **J Vector Borne Dis**, 55, n. 1, p. 1-8, 2018 Jan-Mar 2018.

DEANS, J. A.; KNIGHT, A. M.; JEAN, W. C.; WATERS, A. P. *et al.* Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. **Parasite Immunol**, 10, n. 5, p. 535-552, Sep 1988.

DEL TORDELLO , E.; DELANY , R. R. I. Reverse Vaccinology : Exploiting Genomes for Vaccine Design. *In: Human Vaccines*, 2017.

DIEZ BENAVENTE, E.; WARD, Z.; CHAN, W.; MOHAREB, F. R. *et al.* Genomic variation in *Plasmodium vivax* malaria reveals regions under selective pressure. **PLoS One**, 12, n. 5, p. e0177134, 2017.

DOBRESCU, I.; DE CAMARGO, T. M.; GIMENEZ, A. M.; MURILLO, O. *et al.* Protective Immunity in Mice Immunized With. **Front Immunol**, 11, p. 28, 2020.

DODOO, D.; AIKINS, A.; KUSI, K. A.; LAMPTEY, H. *et al.* Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. **Malar J**, 7, p. 142, Jul 29 2008.

DORFMAN, J. R.; BEJON, P.; NDUNGU, F. M.; LANGHORNE, J. *et al.* B cell memory to 3 *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in a malaria-endemic area. **J Infect Dis**, 191, n. 10, p. 1623-1630, May 2005.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, 8, p. 4, Jan 2007.

DRAPER, S. J.; SACK, B. K.; KING, C. R.; NIELSEN, C. M. *et al.* Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. **Cell Host Microbe**, 24, n. 1, p. 43-56, Jul 11 2018.

DUFFY, P. E.; PATRICK GORRES, J. Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. **NPJ Vaccines**, 5, n. 1, p. 48, 2020.

DUTTA, S.; HAYNES, J. D.; MOCH, J. K.; BARBOSA, A. *et al.* Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 21, p. 12295-12300, Oct 2003.

ESCALANTE, A. A.; LAL, A. A.; AYALA, F. J. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Genetics**, 149, n. 1, p. 189-202, May 1998.

FIGUEIREDO, M. M.; COSTA, P. A. C.; DINIZ, S. Q.; HENRIQUES, P. M. *et al.* T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. **PLoS Pathog**, 13, n. 7, p. e1006484, Jul 2017.

FIGUEIREDO, R. T.; FERNANDEZ, P. L.; MOURAO-SA, D. S.; PORTO, B. N. *et al.* Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, 282, n. 28, p. 20221-20229, Jul 2007.

FONSECA, J. A.; CABRERA-MORA, M.; SINGH, B.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* A chimeric protein-based malaria vaccine candidate induces robust T cell responses against *Plasmodium vivax* MSP1. **Sci Rep**, 6, p. 34527, Oct 06 2016.

FOWKES, F. J.; RICHARDS, J. S.; SIMPSON, J. A.; BEESON, J. G. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Med**, 7, n. 1, p. e1000218, Jan 19 2010.

GAUR, D.; MAYER, D. C.; MILLER, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int J Parasitol**, 34, n. 13-14, p. 1413-1429, Dec 2004.

GAZZINELLI, R. T.; KALANTARI, P.; FITZGERALD, K. A.; GOLENBOCK, D. T. Innate sensing of malaria parasites. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 11, p. 744-757, Nov 2014.

GENTON, B.; D'ACREMONT, V.; RARE, L.; BAEA, K. *et al.* *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Med**, 5, n. 6, p. e127, Jun 2008.

GHUMRA, A.; KHUNRAE, P.; ATAIDE, R.; RAZA, A. *et al.* Immunisation with recombinant PfEMP1 domains elicits functional rosette-inhibiting and phagocytosis-inducing antibodies to *Plasmodium falciparum*. **PLoS One**, 6, n. 1, p. e16414, Jan 31 2011.

GONZALES, S. J.; REYES, R. A.; BRADDOM, A. E.; BATUGEDARA, G. *et al.* Naturally Acquired Humoral Immunity Against. **Front Immunol**, 11, p. 594653, 2020.

GREENWOOD, B. M. Asymptomatic malaria infections--do they matter? **Parasitol Today**, 3, n. 7, p. 206-214, Jul 1987.

GUPTA, D. K.; DEMBELE, L.; VOORBERG-VAN DER WEL, A.; ROMA, G. *et al.* The. **Elife**, 8, 05 2019.

GURAL, N.; MANCIO-SILVA, L.; MILLER, A. B.; GALSTIAN, A. *et al.* In Vitro Culture, Drug Sensitivity, and Transcriptome of Plasmodium Vivax Hypnozoites. **Cell Host Microbe**, 23, n. 3, p. 395-406.e394, Mar 2018.

HAFALLA, J. C.; COCKBURN, I. A.; ZAVALA, F. Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. **Parasite Immunol**, 28, n. 1-2, p. 15-24, 2006.

HAMRE, K. E. S.; ONDIGO, B. N.; HODGES, J. S.; DUTTA, S. *et al.* Antibody Correlates of Protection from Clinical. **Am J Trop Med Hyg**, 103, n. 6, p. 2174-2182, Dec 2020.

HAN, J. H.; CHO, J. S.; CHENG, Y.; MUH, F. *et al.* Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 Paralog as a Mediator of Parasite Adherence to Reticulocytes. **Infect Immun**, 86, n. 9, 09 2018.

HAYNES, J. D.; DIGGS, C. L.; HINES, F. A.; DESJARDINS, R. E. Culture of human malaria parasites Plasmodium falciparum. **Nature**, 263, n. 5580, p. 767-769, Oct 1976.

HE, W. Q.; SHAKRI, A. R.; BHARDWAJ, R.; FRANÇA, C. T. *et al.* Antibody responses to Plasmodium vivax Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical Malaria. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 2, p. e0006987, 02 2019.

HELMBY, H.; JÖNSSON, G.; TROYE-BLOMBERG, M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage Plasmodium chabaudi chabaudi AS. **Infect Immun**, 68, n. 3, p. 1485-1490, Mar 2000.

HISAEDA, H.; YASUTOMO, K.; HIMENO, K. Malaria: immune evasion by parasites. **Int J Biochem Cell Biol**, 37, n. 4, p. 700-706, Apr 2005.

HOLLINGDALE, M. R.; NARDIN, E. H.; THARAVANIJ, S.; SCHWARTZ, A. L. *et al.* Inhibition of entry of Plasmodium falciparum and P. vivax sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. **J Immunol**, 132, n. 2, p. 909-913, Feb 1984.

HORSTMANN, R. D.; DIETRICH, M.; BIENZLE, U.; RASCHE, H. Malaria-induced thrombocytopenia. **Blut**, 42, n. 3, p. 157-164, Mar 1981.

HOSTETLER, J. B.; SHARMA, S.; BARTHOLDSON, S. J.; WRIGHT, G. J. *et al.* A Library of Plasmodium vivax Recombinant Merozoite Proteins Reveals New Vaccine Candidates and Protein-Protein Interactions. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, n. 12, p. e0004264, Dec 2015.

HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; MENDIS, K. N.; SMITH, D. L. *et al.* Global Epidemiology of Plasmodium vivax. **Am J Trop Med Hyg**, 95, n. 6 Suppl, p. 15-34, Dec 2016.

HVIID, L.; BARFOD, L.; FOWKES, F. J. Trying to remember: immunological B cell memory to malaria. **Trends Parasitol**, 31, n. 3, p. 89-94, Mar 2015.

HVIID, L.; KEMP, K. What is the cause of lymphopenia in malaria? **Infect Immun**, 68, n. 10, p. 6087-6089, Oct 2000.

ILLINGWORTH, J.; BUTLER, N. S.; ROETYNCK, S.; MWACHARO, J. *et al.* Chronic exposure to Plasmodium falciparum is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. **J Immunol**, 190, n. 3, p. 1038-1047, Feb 2013.

JESPERSEN, M. C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Res**, 45, n. W1, p. W24-W29, Jul 2017.

JUNQUEIRA, C.; BARBOSA, C. R. R.; COSTA, P. A. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Cytotoxic CD8. **Nat Med**, 24, n. 9, p. 1330-1336, 09 2018.

KASSA, D.; PETROS, B.; MESELE, T.; HAILU, E. *et al.* Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute Plasmodium falciparum and P. vivax malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. **Clin Vaccine Immunol**, 13, n. 3, p. 376-379, Mar 2006.

KINI, R. G.; CHANDRASHEKHAR, J. Parasite and the Circulating Pool- Characterisation of Leukocyte Number and Morphology in Malaria. **J Clin Diagn Res**, 10, n. 5, p. EC44-48, May 2016.

KINYANJUI, S. M.; BULL, P.; NEWBOLD, C. I.; MARSH, K. Kinetics of antibody responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocyte variant surface antigens. **J Infect Dis**, 187, n. 4, p. 667-674, Feb 2003.

KINYANJUI, S. M.; CONWAY, D. J.; LANAR, D. E.; MARSH, K. IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. **Malar J**, 6, p. 82, Jun 2007.

KLOTZ, F. W.; HADLEY, T. J.; AIKAWA, M.; LEECH, J. *et al.* A 60-kDa *Plasmodium falciparum* protein at the moving junction formed between merozoite and erythrocyte during invasion. **Mol Biochem Parasitol**, 36, n. 2, p. 177-185, Sep 1989.

KOCHAYOO, P.; CHANGROB, S.; WANGRIATISAK, K.; LEE, S. K. *et al.* The persistence of naturally acquired antibodies and memory B cells specific to rhoptry proteins of *Plasmodium vivax* in patients from areas of low malaria transmission. **Malar J**, 18, n. 1, p. 382, Nov 29 2019.

KOCHAYOO, P.; KITTISENACHAI, N.; CHANGROB, S.; WANGRIATISAK, K. *et al.* The acquisition of long-lived memory B cell responses to merozoite surface protein-8 in individuals with *Plasmodium vivax* infection. **Malar J**, 18, n. 1, p. 188, May 31 2019.

KOCHAYOO, P.; SANGUANSUTTIKUL, P.; THAWORNAPAN, P.; WANGRIATISAK, K. *et al.* The presence of circulating antibody secreting cells and long-lived memory B cell responses to reticulocyte binding protein 1a in *Plasmodium vivax* patients. **Malar J**, 20, n. 1, p. 474, Dec 20 2021.

KONGKASURIYACHAI, D.; BARTELS-ANDREWS, L.; STOWERS, A.; COLLINS, W. E. *et al.* Potent immunogenicity of DNA vaccines encoding *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28-evaluation of homologous and heterologous antigen-delivery prime-boost strategy. **Vaccine**, 22, n. 23-24, p. 3205-3213, Aug 13 2004.

KOTEPUI, M.; PHUNPHUECH, B.; PHIWKLAM, N.; CHUPEERACH, C. *et al.* Effect of malarial infection on haematological parameters in population near Thailand-Myanmar border. **Malar J**, 13, p. 218, Jun 05 2014.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 79, n. 1, p. 1-11, 1985.

LACERDA, M. V.; FRAGOSO, S. C.; ALECRIM, M. G.; ALEXANDRE, M. A. *et al.* Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? **Clin Infect Dis**, 55, n. 8, p. e67-74, Oct 2012.

LACERDA, M. V.; MOURAO, M. P.; ALEXANDRE, M. A.; SIQUEIRA, A. M. *et al.* Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malar J**, 11, p. 12, 2012.

LACERDA, M. V.; MOURÃO, M. P.; COELHO, H. C.; SANTOS, J. B. Thrombocytopenia in malaria: who cares? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 106 Suppl 1, p. 52-63, Aug 2011.

LACERDA, M. V. G.; LLANOS-CUENTAS, A.; KRUDSOOD, S.; LON, C. *et al.* Single-Dose Tafenoquine to Prevent Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria. **N Engl J Med**, 380, n. 3, p. 215-228, 01 2019.

LADHANI, S.; LOWE, B.; COLE, A. O.; KOWUONDO, K. *et al.* Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. **Br J Haematol**, 119, n. 3, p. 839-847, Dec 2002.

LALREMRUATA, A.; MAGRIS, M.; VIVAS-MARTÍNEZ, S.; KOEHLER, M. *et al.* Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. **EBioMedicine**, 2, n. 9, p. 1186-1192, Sep 2015.

LANGHORNE, J.; NDUNGU, F. M.; SPONAAS, A. M.; MARSH, K. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat Immunol**, 9, n. 7, p. 725-732, Jul 2008.

LIMA, B. A. S.; FERNANDES, G. M.; TORRES, L. M.; PIRES, C. V. *et al.* Antibody response to a new member of the DBL family (EBP2) after a brief *Plasmodium vivax* exposure. **PLoS Negl Trop Dis**, 16, n. 6, p. e0010493, Jun 2022.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; GUIMARÃES, A. E.; ARLÉ, M.; DA SILVA, T. F. *et al.* Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondônia State, Amazon region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 84, n. 4, p. 501-514, 1989 Oct-Dec 1989.

LY, A.; HANSEN, D. S. Development of B Cell Memory in Malaria. **Front Immunol**, 10, p. 559, 2019.

LÓPEZ, C.; YEPES-PÉREZ, Y.; HINCAPIÉ-ESCOBAR, N.; DÍAZ-ARÉVALO, D. *et al.* What Is Known about the Immune Response Induced by. **Front Immunol**, 8, p. 126, 2017.

MAGALHÃES, B. M.; SIQUEIRA, A. M.; ALEXANDRE, M. A.; SOUZA, M. S. *et al.* *P. vivax* malaria and dengue fever co-infection: a cross-sectional study in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 10, p. e3239, Oct 2014.

MALKIN, E. M.; DURBIN, A. P.; DIEMERT, D. J.; SATTABONGKOT, J. *et al.* Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine**, 23, n. 24, p. 3131-3138, May 2005.

MALLERET, B.; LI, A.; ZHANG, R.; TAN, K. S. *et al.* *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. **Blood**, 125, n. 8, p. 1314-1324, Feb 19 2015.

MANTEL, P. Y.; MARTI, M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. **Cell Microbiol**, 16, n. 3, p. 344-354, Mar 2014.

MARSH, K.; HOWARD, R. J. Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. **Science**, 231, n. 4734, p. 150-153, Jan 1986.

MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunol**, 28, n. 1-2, p. 51-60, 2006 Jan-Feb 2006.

MATUSCHEWSKI, K.; ROSS, J.; BROWN, S. M.; KAISER, K. *et al.* Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. **J Biol Chem**, 277, n. 44, p. 41948-41953, Nov 2002.

MCKENZIE, F. E.; PRUDHOMME, W. A.; MAGILL, A. J.; FORNEY, J. R. *et al.* White blood cell counts and malaria. **J Infect Dis**, 192, n. 2, p. 323-330, Jul 15 2005.

MENDES, C.; DIAS, F.; FIGUEIREDO, J.; MORA, V. G. *et al.* Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). **PLoS Negl Trop Dis**, 5, n. 6, p. e1192, Jun 2011.

MILES, A. P.; ZHANG, Y.; SAUL, A.; STOWERS, A. W. Large-scale purification and characterization of malaria vaccine candidate antigen Pvs25H for use in clinical trials. **Protein Expr Purif**, 25, n. 1, p. 87-96, Jun 2002.

MILNER, D. A. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 8, n. 1, 01 2018.

MIN, H. M. K.; CHANGROB, S.; SOE, P. T.; HAN, J. H. *et al.* Immunogenicity of the Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 paralog in the induction of naturally acquired antibody and memory B cell responses. **Malar J**, 16, n. 1, p. 354, Aug 30 2017.

MODIANO, D.; SIRIMA, B. S.; KONATÉ, A.; SANOU, I. *et al.* Leucocytosis in severe malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 95, n. 2, p. 175-176, 2001.

MOIR, S.; HO, J.; MALASPINA, A.; WANG, W. *et al.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. **J Exp Med**, 205, n. 8, p. 1797-1805, Aug 2008.

MORENO-PÉREZ, D. A.; DÉGANO, R.; IBARROLA, N.; MURO, A. *et al.* Determining the Plasmodium vivax VCG-1 strain blood stage proteome. **J Proteomics**, 113, p. 268-280, 01 2015.

MS. **Boletim Epidemiológico: Malária 2020**. Secretaria de Vigilância em Saúde- Ministério da Saúde. 2020a.

MS. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_tratamento_malaria_brasil.pdf <http://bvsmms.saude.gov.br/guia_publicacoes/tratamento_malaria_brasil.pdf>: 2020b. 978-85-334-2754-9. 76 p.

MS, M. D. S. Tafenoquina para tratamento de pacientes com malária por Plasmodium vivax. Relatório de Recomendação - Medicamentos 2021.

MS, M. D. S. **Boletins Epidemiológicos de Malária**. https://public.tableau.com/app/profile/mal.ria.brasil/viz/Dadosparacidado_201925_03_2020/Incio, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria-1>. Acesso em: 14 de abril.

MUELLENBECK, M. F.; UEBERHEIDE, B.; AMULIC, B.; EPP, A. *et al.* Atypical and classical memory B cells produce Plasmodium falciparum neutralizing antibodies. **J Exp Med**, 210, n. 2, p. 389-399, Feb 11 2013.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M. *et al.* Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Dis**, 9, n. 9, p. 555-566, Sep 2009.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; TSUBOI, T.; AREVALO-HERRERA, M. *et al.* Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. **Adv Parasitol**, 81, p. 77-131, 2013.

MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine**, 33, n. 52, p. 7489-7495, Dec 2015.

NARUM, D. L.; OGUN, S. A.; THOMAS, A. W.; HOLDER, A. A. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. **Infect Immun**, 68, n. 5, p. 2899-2906, May 2000.

NDUATI, E. W.; NG, D. H.; NDUNGU, F. M.; GARDNER, P. *et al.* Distinct kinetics of memory B-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice. **PLoS One**, 5, n. 11, p. e15007, Nov 2010.

NDUNGU, F. M.; LUNDBLOM, K.; RONO, J.; ILLINGWORTH, J. *et al.* Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. **Eur J Immunol**, 43, n. 11, p. 2919-2929, Nov 2013.

NICOLETE, V. C.; FRISCHMANN, S.; BARBOSA, S.; KING, C. L. *et al.* Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. **J Infect Dis**, 214, n. 10, p. 1539-1546, 11 15 2016.

NOGARO, S. I.; HAFALLA, J. C.; WALTHER, B.; REMARQUE, E. J. *et al.* The breadth, but not the magnitude, of circulating memory B cell responses to *P. falciparum* increases with age/exposure in an area of low transmission. **PLoS One**, 6, n. 10, p. e25582, 2011.

NOGUEIRA, P. A.; ALVES, F. P.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; PEIN, O. *et al.* A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. **Infect Immun**, 74, n. 5, p. 2726-2733, May 2006.

O'FLAHERTY, K.; ROE, M.; FOWKES, F. J. I. The role of naturally acquired antimalarial antibodies in subclinical *Plasmodium* spp. infection. **J Leukoc Biol**, 111, n. 5, p. 1097-1105, May 2022.

OBALDIA, N. Determinants of low socio-economic status and risk of Plasmodium vivax malaria infection in Panama (2009-2012): a case-control study. **Malar J**, 14, p. 14, Jan 2015.

OFORI, M. F.; DODOO, D.; STAALSOE, T.; KURTZHALS, J. A. *et al.* Malaria-induced acquisition of antibodies to Plasmodium falciparum variant surface antigens. **Infect Immun**, 70, n. 6, p. 2982-2988, Jun 2002.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; VARGAS-SERRATO, E.; BARNWELL, J. W.; MORENO, A. *et al.* Immunogenicity of Plasmodium vivax merozoite surface protein-9 recombinant proteins expressed in E. coli. **Vaccine**, 22, n. 15-16, p. 2023-2030, May 2004.

ORITO, Y.; ISHINO, T.; IWANAGA, S.; KANEKO, I. *et al.* Liver-specific protein 2: a Plasmodium protein exported to the hepatocyte cytoplasm and required for merozoite formation. **Mol Microbiol**, 87, n. 1, p. 66-79, Jan 2013.

OSIER, F. H.; FEGAN, G.; POLLEY, S. D.; MURUNGI, L. *et al.* Breadth and magnitude of antibody responses to multiple Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. **Infect Immun**, 76, n. 5, p. 2240-2248, May 2008.

OUATTARA, A.; BARRY, A. E.; DUTTA, S.; REMARQUE, E. J. *et al.* Designing malaria vaccines to circumvent antigen variability. **Vaccine**, 33, n. 52, p. 7506-7512, Dec 22 2015.

PANG, A. L.; HASHIMOTO, C. N.; TAM, L. Q.; MENG, Z. Q. *et al.* In vivo expression and immunological studies of the 42-kilodalton carboxyl-terminal processing fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 in the baculovirus-silkworm system. **Infect Immun**, 70, n. 6, p. 2772-2779, Jun 2002.

PATGAONKAR, M.; HERBERT, F.; POWALE, K.; GANDHE, P. *et al.* Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. **Parasite Immunol**, 40, n. 10, p. e12580, Oct 2018.

PAYNE, R. O.; SILK, S. E.; ELIAS, S. C.; MILNE, K. H. *et al.* Human vaccination against Plasmodium vivax Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. **JCI Insight**, 2, n. 12, Jun 15 2017.

PEARSON, R. D.; AMATO, R.; AUBURN, S.; MIOTTO, O. *et al.* Genomic analysis of local variation and recent evolution in *Plasmodium vivax*. **Nat Genet**, 48, n. 8, p. 959-964, 08 2016.

PERERA, K. L.; HANDUNNETTI, S. M.; HOLM, I.; LONGACRE, S. *et al.* Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. **Infect Immun**, 66, n. 4, p. 1500-1506, Apr 1998.

POLLEY, S. D.; MWANGI, T.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W. *et al.* Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. **Vaccine**, 23, n. 5, p. 718-728, Dec 16 2004.

PORTUGAL, S.; OBENG-ADJEI, N.; MOIR, S.; CROMPTON, P. D. *et al.* Atypical memory B cells in human chronic infectious diseases: An interim report. **Cell Immunol**, 321, p. 18-25, Nov 2017.

RAHIMI, B. A.; THAKKINSTIAN, A.; WHITE, N. J.; SIRIVICHAYAKUL, C. *et al.* Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malar J**, 13, p. 481, Dec 2014.

RAMASAMY, R.; YASAWARDENA, S. G.; KANAGARATNAM, R.; BURATTI, E. *et al.* Mammalian cell expression of malaria merozoite surface proteins and experimental DNA and RNA immunisation. **Biochim Biophys Acta**, 1453, n. 1, p. 1-13, Jan 1999.

RATHORE, D.; NAGARKATTI, R.; JANI, D.; CHATTOPADHYAY, R. *et al.* An immunologically cryptic epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and induces protective antibodies that block liver cell invasion. **J Biol Chem**, 280, n. 21, p. 20524-20529, May 27 2005.

REILING, L.; RICHARDS, J. S.; FOWKES, F. J.; WILSON, D. W. *et al.* The *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion ligand Pfrh4 as a target of functional and protective human antibodies against malaria. **PLoS One**, 7, n. 9, p. e45253, 2012.

RICHARD, D.; BARTFAI, R.; VOLZ, J.; RALPH, S. A. *et al.* A genome-wide chromatin-associated nuclear peroxiredoxin from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J Biol Chem**, 286, n. 13, p. 11746-11755, Apr 2011.

RICHARDS, J. S.; ARUMUGAM, T. U.; REILING, L.; HEALER, J. *et al.* Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. **J Immunol**, 191, n. 2, p. 795-809, Jul 2013.

RIJKEN, M. J.; BOEL, M. E.; RUSSELL, B.; IMWONG, M. *et al.* Chloroquine resistant vivax malaria in a pregnant woman on the western border of Thailand. **Malar J**, 10, p. 113, May 2011.

ROSANAS-URGELL, A.; MUELLER, D.; BETUELA, I.; BARNADAS, C. *et al.* Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. **Malar J**, 9, p. 361, Dec 2010.

ROUSSILHON, C.; OEUVRAY, C.; MÜLLER-GRAF, C.; TALL, A. *et al.* Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. **PLoS Med**, 4, n. 11, p. e320, Nov 13 2007.

RTS, S. C. T. P. Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. **PLoS Med**, 11, n. 7, p. e1001685, Jul 2014.

RTS, S. C. T. P. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. **Lancet**, 386, n. 9988, p. 31-45, Jul 04 2015.

RYAN, J. R.; STOUTE, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F. *et al.* Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, 75, n. 4, p. 575-581, Oct 2006.

SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P. *et al.* Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **Am J Trop Med Hyg**, 45, n. 3, p. 297-308, Sep 1991.

SCHOFIELD, L.; MUELLER, I. Clinical immunity to malaria. **Curr Mol Med**, 6, n. 2, p. 205-221, Mar 2006.

SCOTT, C. S.; VAN ZYL, D.; HO, E.; RUIVO, L. *et al.* Thrombocytopenia in patients with malaria: automated analysis of optical platelet counts and platelet clumps with the Cell Dyn CD4000 analyser. **Clin Lab Haematol**, 24, n. 5, p. 295-302, Oct 2002.

SEGUIN, M. C.; BALLOU, W. R.; NACY, C. A. Interactions of Plasmodium berghei sporozoites and murine Kupffer cells in vitro. **J Immunol**, 143, n. 5, p. 1716-1722, Sep 01 1989.

SETH, R. K.; BHAT, A. A.; RAO, D. N.; BISWAS, S. Acquired immune response to defined Plasmodium vivax antigens in individuals residing in northern India. **Microbes Infect**, 12, n. 3, p. 199-206, Mar 2010.

SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; CHARRIN, S.; MUELLER, M. S. *et al.* A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites. **J Biol Chem**, 279, n. 10, p. 9490-9496, Mar 2004.

SIMPSON, J. A.; SILAMUT, K.; CHOTIVANICH, K.; PUKRITTAYAKAMEE, S. *et al.* Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 93, n. 2, p. 165-168, 1999 Mar-Apr 1999.

SIMS, G. P.; ETTINGER, R.; SHIROTA, Y.; YARBORO, C. H. *et al.* Identification and characterization of circulating human transitional B cells. **Blood**, 105, n. 11, p. 4390-4398, Jun 2005.

SINGH, B.; KIM SUNG, L.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A. *et al.* A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. **Lancet**, 363, n. 9414, p. 1017-1024, Mar 2004.

SINGH, K.; MUKHERJEE, P.; SHAKRI, A. R.; SINGH, A. *et al.* Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. **NPJ Vaccines**, 3, p. 48, 2018.

SINKA, M. E.; BANGS, M. J.; MANGUIN, S.; CHAREONVIRIYAPHAP, T. *et al.* The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. **Parasit Vectors**, 4, p. 89, May 2011.

SNOUNOU, G.; SINGH, B. Nested PCR analysis of Plasmodium parasites. **Methods Mol Med**, 72, p. 189-203, 2002.

SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y. *et al.* The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, 434, n. 7030, p. 214-217, Mar 10 2005.

SOARES, R. R.; CUNHA, C. F.; FERRAZ-NOGUEIRA, R.; MARINS-DOS-SANTOS, A. *et al.* Apical membrane protein 1-specific antibody profile and temporal changes in peripheral blood B-cell populations in *Plasmodium vivax* malaria. **Parasite Immunol**, 41, n. 9, p. e12662, 09 2019.

STANISIC, D. I.; RICHARDS, J. S.; MCCALLUM, F. J.; MICHON, P. *et al.* Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. **Infect Immun**, 77, n. 3, p. 1165-1174, Mar 2009.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol**, 4, n. 3, p. 169-180, Mar 2004.

SULLIVAN, R. T.; SSEWANYANA, I.; WAMALA, S.; NANKYA, F. *et al.* B cell sub-types following acute malaria and associations with clinical immunity. **Malar J**, 15, p. 139, Mar 2016.

TA, T. H.; HISAM, S.; LANZA, M.; JIRAM, A. I. *et al.* First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malar J**, 13, p. 68, Feb 2014.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M.; SCARPASSA, V. M. *et al.* Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg**, 59, n. 2, p. 325-335, Aug 1998.

TAKALA, S. L.; PLOWE, C. V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. **Parasite Immunol**, 31, n. 9, p. 560-573, Sep 2009.

TANGPUKDEE, N.; YEW, H. S.; KRUDSOOD, S.; PUNYAPRADIT, N. *et al.* Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. **Parasitol Int**, 57, n. 4, p. 490-494, Dec 2008.

TEKA, H.; PETROS, B.; YAMUAH, L.; TESFAYE, G. *et al.* Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Debre Zeit, Ethiopia. **Malar J**, 7, p. 220, Oct 2008.

TEO, A.; FENG, G.; BROWN, G. V.; BEESON, J. G. *et al.* Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. **Trends Parasitol**, 32, n. 11, p. 887-898, 11 2016.

TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; SUGIARTO, P.; WARIKAR, N. *et al.* Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Med**, 5, n. 6, p. e128, Jun 2008.

TOURE-BALDE, A.; SARTHOU, J. L.; ARIBOT, G.; MICHEL, P. *et al.* *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. **Infect Immun**, 64, n. 3, p. 744-750, Mar 1996.

TRAN, T. M.; LI, S.; DOUMBO, S.; DOUMTABE, D. *et al.* An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. **Clin Infect Dis**, 57, n. 1, p. 40-47, Jul 2013.

TRAN, T. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; MORENO, A.; SANTOS, F. *et al.* Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. **Am J Trop Med Hyg**, 73, n. 2, p. 244-255, Aug 2005.

TRAN, T. M.; ONGOIBA, A.; COURSEN, J.; CROSNIER, C. *et al.* Naturally acquired antibodies specific for *Plasmodium falciparum* reticulocyte-binding protein homologue 5 inhibit parasite growth and predict protection from malaria. **J Infect Dis**, 209, n. 5, p. 789-798, Mar 01 2014.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nat Rev Immunol**, 2, n. 10, p. 735-747, Oct 2002.

TRIGLIA, T.; HEALER, J.; CARUANA, S. R.; HODDER, A. N. *et al.* Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Mol Microbiol**, 38, n. 4, p. 706-718, Nov 2000.

TURPEN, T. H.; REINL, S. J.; CHAROENVIT, Y.; HOFFMAN, S. L. *et al.* Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. **Biotechnology (N Y)**, 13, n. 1, p. 53-57, Jan 1995.

TUTEJA, R. Malaria - an overview. **FEBS J**, 274, n. 18, p. 4670-4679, Sep 2007.

UDAGAMA, P. V.; ATKINSON, C. T.; PEIRIS, J. S.; DAVID, P. H. *et al.* Immunoelectron microscopy of Schüffner's dots in *Plasmodium vivax*-infected human erythrocytes. **Am J Pathol**, 131, n. 1, p. 48-52, Apr 1988.

UDHAYAKUMAR, V.; KARIUKI, S.; KOLCZACK, M.; GIRMA, M. *et al.* Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. **Am J Trop Med Hyg**, 65, n. 2, p. 100-107, Aug 2001.

VANDERBERG, J. P.; FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. **Int J Parasitol**, 34, n. 9, p. 991-996, Aug 2004.

VICENTIN, E. C.; FRANÇOSO, K. S.; ROCHA, M. V.; IOURTOV, D. *et al.* Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. **Infect Immun**, 82, n. 3, p. 1296-1307, Mar 2014.

VILLARD, V.; AGAK, G. W.; FRANK, G.; JAFARSHAD, A. *et al.* Rapid identification of malaria vaccine candidates based on alpha-helical coiled coil protein motif. **PLoS One**, 2, n. 7, p. e645, Jul 25 2007.

WANG, Q.; ZHAO, Z.; ZHANG, X.; LI, X. *et al.* Naturally Acquired Antibody Responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia. **PLoS One**, 11, n. 3, p. e0151900, 2016.

WEISS, G. E.; CROMPTON, P. D.; LI, S.; WALSH, L. A. *et al.* Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. **J Immunol**, 183, n. 3, p. 2176-2182, Aug 01 2009.

WHITE, N. J. Anaemia and malaria. **Malar J**, 17, n. 1, p. 371, Oct 19 2018.

WHITE, N. J.; IMWONG, M. **Advances in Parasitology**. 2012.

WHO. **World Malaria Report 2015**. 2015. 280 p.

WHO. **World Malaria Report 2022**. 2022.

WHO, W. H. O. Guidelines for the treatment of malaria. 2015.

WHO, W. H. O. World Malaria Report 2020. 2020.

WHO, W. H. O. World Malaria Report 2021. 322 p. 2021.

WILSON, K. L.; FLANAGAN, K. L.; PRAKASH, M. D.; PLEBANSKI, M. Malaria vaccines in the eradication era: current status and future perspectives. **Expert Rev Vaccines**, 18, n. 2, p. 133-151, 02 2019.

WIPASA, J.; ELLIOTT, S.; XU, H.; GOOD, M. F. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunol Cell Biol**, 80, n. 5, p. 401-414, Oct 2002.

WIPASA, J.; SUPHAVILAI, C.; OKELL, L. C.; COOK, J. *et al.* Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **PLoS Pathog**, 6, n. 2, p. e1000770, Feb 19 2010.

WU, Y.; ELLIS, R. D.; SHAFFER, D.; FONTES, E. *et al.* Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. **PLoS One**, 3, n. 7, p. e2636, Jul 2008.

ANEXOS

Anexo I: Tabela 5. Anotações das sequências gênicas de *P. vivax* (Sal-1) utilizadas como critério de exclusão durante a etapa de pré-seleção in silico.

Anotações de genes não selecionados	
DNA	Centrosome
RNA	Spectrin
Vir	Origin recognition complex
Pir	Cloroquin
Chromos	ase
Keratin	Ribosom
Lamin	Tubulin
Septin	Actin
Uniquitin	Myosin
Inner membrane	Vimetin
Mithocond	Centrin
Chromossom	Protein transport
Nude	Heat shock
Histone	Transcription
Transporter	Proteasome
Desmin	

Anexo II: Mapa do vetor de expressão pEGFP.

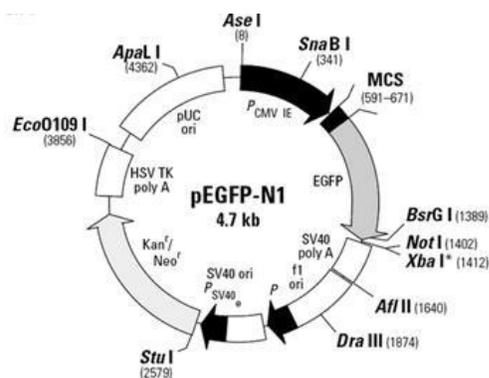


Figura 35. Mapa do vetor de expressão pEGFP. No mapa encontram-se destacados os sítios de restrição e sítios múltiplos de clonagem (MCS) bem como os genes de resistência.

Anexo III: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da imunogenicidade e geração de memória imunológica de potenciais candidatos vacinais contra a malária vivax

Pesquisador: Stefanie Costa Pinto Lopes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 84250218.4.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.584.967

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Tese de Doutorado, onde os pesquisadores buscam principalmente avaliar a capacidade imunogênica e a memória imunológica gerada por potenciais candidatos vacinais de *Plasmodium vivax*.

Para tanto, serão incluído no estudo 130 participantes, com idade entre 18 e 60 anos, com malária em estágio agudo e convalescentes, que serão submetidos a coleta de 80ml de sangue periférico de cada participante. As amostras de sangue serão coletadas de pacientes após o diagnóstico de malária vivax pelo método de gota espessa, anteriormente ao tratamento da doença, sendo este considerado o dia 0. O paciente que concordar em participar deste estudo será convidado a comparecer novamente no hospital em dois momentos adicionais, sendo estes 45 e 180 dias após a primeira coleta. Posteriormente, as células B de memória serão purificadas e fenotipadas e os anticorpos produzidos por elas serão caracterizados.

Paralelamente, as proteínas selecionadas a partir de análises *in silico* serão expressas em sistema eucarioto e utilizadas para gerar anticorpos policlonais em camundongos. Estes anticorpos serão utilizados em ensaios de inibição de invasão *in vitro*. O estudo tem apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, no valor de R\$ 27.000,00.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.584.967

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a capacidade imunogênica e a memória imunológica gerada por potenciais candidatos vacinais de *Plasmodium vivax*.

Objetivo Secundário:

(I)Selecionar, a partir de análises *in silico*, potenciais antígenos baseado nos resultados referentes à antigenicidade e adesividade;

(II)Verificar a presença de anticorpos naturalmente adquiridos contra os candidatos vacinais aqui estudados;

(III)Avaliar a capacidade dos anticorpos em estudo inibirem a invasão de *P. vivax*;

(IV)Investigar o perfil fenotípico de células B (incluindo CBM clássicas e atípicas) em indivíduos naturalmente expostos a *P. vivax*;

(V)Averiguar a geração e persistência de anticorpos e células B de memória (CBM) direcionadas às proteínas recombinantes de estágio sanguíneo em estudo;(VI)Avaliar a avidéz entre antígenos e anticorpos aqui estudados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os únicos riscos aos participantes deste pesquisa são os riscos associados com a coleta de sangue, que incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar o desconforto na hora da coleta. As coletas serão realizadas por uma pessoa treinada e serão utilizados tubos vacutainer que agilizam a coleta.

Benefícios:

O participante não será beneficiado diretamente pela participação neste estudo. Trata-se de um estudo sobre a resposta imune gerada por pacientes infectados por *Plasmodium vivax*, que gerará resultados a longo prazo. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão contribuir e para o desenvolvimento de vacinas contra a malária.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.584.967

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante visto tratar-se de estudo que busca vacinas contra a malária vivax.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além dos termos anexados anteriormente ao Protocolo (Informações Básicas do Projeto; Folha de Rosto; Projeto Detalhado; Ficha_individual_de_acompanhamento; Currículo do pesquisadora e assistente; TCLE), a nova versão do Protocolo trás os seguintes anexos: Folha resposta, novo TCLE, novo Projeto Detalhado, Anuência gerencia de malária.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de segunda avaliação do Protocolo de pesquisa, na qual será verificado o atendimento das pendências apontadas no parecer anterior, conforme segue:

Pendência 1. No Projeto de pesquisa a pesquisadora informa que o estudo será realizado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), contudo, não informa o (s) setor (es) da FMT-HVD, envolvidos na pesquisa, onde serão coletadas e armazenadas as amostras de sangue. Sendo assim, solicita-se esclarecimento quanto ao (s) setor (es) onde serão coletadas e armazenadas as amostras.

Resposta: As coletas, processamento e armazenamento das amostras de sangue serão realizadas junto ao setor Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Esta especificação foi incluída na metodologia descrita na Plataforma Brasil e no projeto detalhado anexado ao Protocolo.

Análise: Pendência atendida.

Pendência 2. Os termos de anuência do (s) setor (es) envolvido (s) no estudo não estão anexados ao Protocolo de pesquisa. Solicita-se que os termos de anuências dos setores da FMT-HVD, sejam anexados ao Protocolo de pesquisa.

Resposta: Os termos de anuência foram anexados ao Protocolo de pesquisa.

Análise: Pendência atendida.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.584.967

Pendência 3. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE é o documento no qual é explicitado o consentimento livre e esclarecido do participante e/ou de seu responsável legal, devendo conter todas as informações necessárias, em linguagem clara e objetiva, de fácil entendimento, para o mais completo esclarecimento sobre a pesquisa a qual se propõe participar.

O Modelo do TCLE anexado ao Protocolo de pesquisa, não atende na íntegra, o item IV da Resolução CNS no 466/2012. Nesse contexto faz-se, necessário elaborar o TCLE, atentando para o Artigo IV – DO PROCESSO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, respeitando principalmente os itens IV.3; IV.4 e IV.5., da Resolução CNS no 466/2012.

Resposta: Foram realizadas modificações no Termo de consentimento livre e esclarecido para que ficasse mais claro os objetivos da pesquisa e para que os itens que constam no artigo IV da Resolução CNS nº 466/2012 fossem atendidos na íntegra. Os esclarecimentos ao paciente referentes aos itens IV.3; IV.4 e IV.5., da Resolução CNS no 466/2012 foram adicionados ao TCLE nos tópicos "Coletas de Sangue" e "Informações ao Paciente".

Análise: Pendência atendida.

Assim sendo e por entender que os interessados acataram todas as solicitações, este relator vota pela aprovação do Protocolo.

S.M.J. É o parecer.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.584.967

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_907634.pdf	20/03/2018 00:58:13		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIA_MEMORIA1.pdf	20/03/2018 00:57:39	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	FOLHA_RESPOSTA.docx	19/03/2018 19:53:11	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	19/03/2018 19:48:12	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado.pdf	19/03/2018 19:45:50	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_memoria.pdf	27/02/2018 23:53:34	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 06 de Abril de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

Anexo IV: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

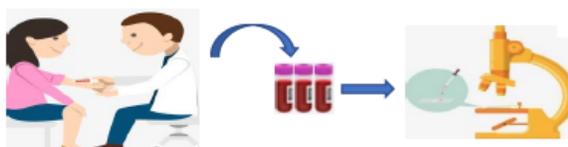
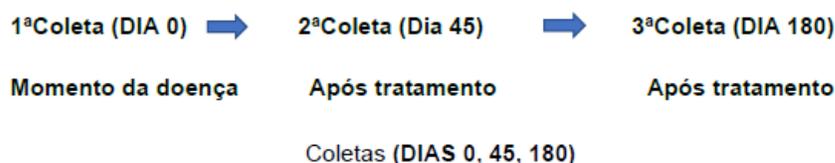


TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto de Pesquisa: Avaliação da imunogenicidade e geração de memória imunológica de potenciais candidatos vacinais contra a malária vivax

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em parceria com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) está fazendo um estudo com o objetivo de estudar como o organismo humano se defende do *Plasmodium vivax*, o causador da doença que você tem no momento e como o parasito pode alterar os mecanismos de defesa naturais do organismo. Este estudo poderá auxiliar no desenvolvimento de uma nova vacina contra a malária. Para isso, é preciso que seja feita a retirada de 80ml de sangue do paciente infectado com malária vivax para realização de alguns testes e ensaios funcionais.

Para nos ajudar a entender esse problema, precisamos realizar uma coleta no momento da doença e outras duas coletas depois do tratamento da doença. Desta forma, é necessário um retorno ao hospital 45 dias e 180 dias depois da primeira coleta. Conforme esquema abaixo:



Coleta de Sangue

Todo o procedimento de coleta será feito por uma pessoa da nossa equipe treinada e com experiência, utilizando material descartável e com total higiene. Após a coleta de sangue, poderá ocorrer dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente poderá ocorrer desmaio ou infecções no local da punção. Todos os cuidados serão tomados para minimizar esses riscos.

Caso você se sinta mal durante a coleta, os pesquisadores responsáveis pelo estudo irão encaminhar você para um médico especializado deste mesmo hospital para lhe examinar e oferecer tratamento, se necessário. Todas as amostras serão coletadas e identificadas com códigos, o nome do paciente nunca será divulgado.

É importante lembrar que a quantidade de sangue a ser coletada não representa qualquer risco para a saúde. A participação nesse estudo não oferece riscos futuros à sua saúde e você não receberá nenhum dinheiro por participar dele. Não há benefício direto para o participante desse estudo. No entanto, os resultados obtidos poderão ajudar a futuramente desenhar novas vacinas para a prevenção de novos casos de malária vivax. Vale salientar que é garantida a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Informações ao paciente

A qualquer momento você pode desistir de participar ou solicitar a retirada de seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo para o seu tratamento contra a doença.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores para que eles possam tirar sua dúvida. Você poderá também fazer contato com a Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes, responsável pelo projeto, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 17 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 99342-6163 (qualquer dia e horário).

Todos os procedimentos serão realizados segundo as exigências contidas nos itens IV. 3 e IV.4 do CNS Resolução nº466 de 2012.

Este TCLE possui duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Desta forma,

Eu,

__fui esclarecido sobre o objetivo da pesquisa e da importância da minha participação neste projeto em todos os momentos de coleta e aceito participar por meio da doação de sangue que será utilizado no estudo "Avaliação da imunogenicidade e geração de memória imunológica de potenciais candidatos vacinais contra a malária vivax". Considero-me satisfeito com as informações fornecidas e concordo em participar desta pesquisa.

Data: ____ / ____ / ____

Endereço:

Telefone residencial: () _____ Telefone Celular: () _____

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário:

Anexo V: Ficha Individual de Acompanhamento



Ficha Individual de Acompanhamento



Projeto de Pesquisa: Avaliação da imunogenicidade e geração de memória imunológica de potenciais candidatos vacinais contra a malária vivax.

Dados Pessoais

Data de inclusão: ___/___/___

Código no estudo: _____

Nome: _____

Nome da mãe: _____

Data de nascimento: ___/___/___

Idade: _____

Escolaridade: _____

Local da Infecção: _____

Sexo: _____

Gestante: Sim () Não ()

Tempo que mora da localidade: _____

Coleta: D0 () D30 () D 90 () D180 ()

Doença autoimune (Lupos, diabetes tipo I, psoríase...): Sim () Não ()

Imunossuprimido (HIV, hepatite, leishmaniose...): Sim () Não ()

Malária prévia

Já teve malária diagnosticada anteriormente?

Sim () Quantas? _____ Não/ Não lembra ()

Última malária foi há: _____ Não lembra/ não sabe: _____

Espécie: *Plasmodium vivax* () *Plasmodium falciparum* ()

Malária desde a última visita: Sim () Não () Há quanto tempo? _____

Dados Clínicos

Sintomas nos últimos 30 dias? Sim () Não ()

Sintomas nos últimos 7 dias? Sim () Não ()

Data do primeiro sintoma: _____

Parou há quantos dias? _____

Peso: _____

Classificação dos sintomas:

Sintomas	Intensidade		
	Leve	Moderado	Intenso
Febre			
Calafrio			
Cefaleia			
Sudorese			
Tontura			
Fraqueza			
Perda de apetite			
Dor abdominal			
Náuseas			
Vômitos			
Diarreia			
Mialgia			
Altrargia			
Lombalgia			
Outro ()			
Qual?			

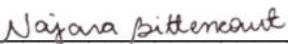
Entrevistador: _____

Anexo VI: Declaração de Direitos Autorais

Declaração

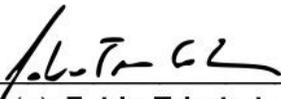
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NATURALMENTE ADQUIRIDA E LONGEVIDADE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS CONTRA POTENCIAIS CANDIDATOS VACINAIS DE *Plasmodium vivax***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28 de agosto de 2023

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Najara Carneiro Bittencourt**

RG n.º 5104834361

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Fabio Trindade Maranhão Costa**

RG n.º 1263942 SSP-DF

Anexo VII: Produção científica

Durante o período em que este doutorado foi desenvolvido, os seguintes trabalhos foram realizados e publicados:

1. SCHAPPO, A. P.; BITTENCOURT, N.C.; BERTOLLA, L. P.; FORCELLINI, S.; ENEMBRECK DA SILVA, A.B.I.; DOS SANTOS, H. G.; GERVÁSIO, J. H.; LACERDA, M. V. G.; LOPES, S. C. P.; COSTA, F. T. M.; ALBRECHT, L. Antigenicity and adhesiveness of a *Plasmodium vivax* VIR-E protein from Brazilian isolates. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 116, 2021.
2. BITTENCOURT, NAJARA C.; BERTOLLA, LETÍCIA P.; ALBRECHT, LETUSA. Insights on Rosetting Phenomenon in *Plasmodium vivax* Malaria. Current Clinical Microbiology Reports, v. 7, p. 1, 2021.
3. SILVA-FILHO, JOAO LUIZ; DE OLIVEIRA, LILIAN G.; MONTEIRO, LETICIA; PARISE, PIERINA L.; ZANLUQUI, NAGELA G.; POLONIO, CAROLINA M.; DE FREITAS, CARLA L.; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A.; DE SOUZA, WILLIAM M.; BITTENCOURT, NAJARA; AMORIM, MARIENE R.; FORATO, JULIA; MURARO, STÉFANIE P.; DE SOUZA, GABRIELA F.; MARTINI, MATHEUS C.; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA; VIEIRA, ALINE; JUDICE, CARLA C.; PASTORE, GLAUCIA M.; AMARAL, ELIANA; PASSINI JUNIOR, RENATO; MAYER-MILANEZ, HELAINE M.B.P.; RIBEIRO-DO-VALLE, CAROLINA C.; CALIL, ROSELI; RENATO BENNINI JUNIOR, JOÃO; LAJOS, GIULIANE J.; ALTEMANI, ALBINA; NOLASCO DA SILVA, MARCOS T.; CAROLINA COAN, ANA; FRANCISCA COLELLA-SANTOS, MARIA; VON ZUBEN, ANDREA P.B.; VINOLO, MARCO AURÉLIO R.; ARNS, CLARICE WEIS; CATHARINO, RODRIGO RAMOS; COSTA, MARIA LAURA; ANGERAMI, RODRIGO N.; FREITAS, ANDRÉ R.R.; RESENDE, MARIANGELA R.; GARCIA, MÁRCIA T.; LUIZA MORETTI, MARIA; RENIA, LAURENT; NG, LISA F.P.; ROTHLIN, CARLA V.; COSTA, FABIO T.M.; PERON, JEAN PIERRE SCHATZMANN; PROENÇA-MODENA, JOSÉ LUIZ. Gas6

drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice. *BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY*, v.1, p.1 - 15, 2021.

4. ALBRECHT, LETUSA; LOPES, STEFANIE C. P.; DA SILVA, ANA BEATRIZ IUNG ENEMBRECK; BARBOSA, VANESSA; ALMEIDA, RODRIGO P.; SIQUEIRA, ANDRÉ M.; LEITE, JULIANA ALMEIDA; BITTENCOURT, NAJARA C.; DOS SANTOS, HELLEN GEREMIAS; BOURGARD, CATARINA; GARCIA, LUIZ FERNANDO CARDOSO; KAYANO, ANA CAROLINA A. V.; SOARES, IRENE S.; RUSSELL, BRUCE; RÉNIA, LAURENT; LACERDA, MARCUS V. G.; COSTA, FABIO T. M. Rosettes integrity protects *Plasmodium vivax* of being phagocytized. *Scientific Reports*, v. 10, p. 16706, 2020.

5. JERONIMO, CHRISTIANE MARIA PRADO FARIAS, MARIA EDUARDA LEÃO VAL, FERNANDO FONSECA ALMEIDA SAMPAIO, VANDERSON SOUZA ALEXANDRE, MARCIA ALMEIDA ARAÚJO MELO, GISELY CARDOSO SAFE, IZABELLA PICININ BORBA, MAYLA GABRIELA SILVA ABREU-NETTO, REBECA LINHARES MACIEL, ALEX BEZERRA SILVA NETO, JOÃO RICARDO SILVA OLIVEIRA, LUCAS BARBOSA FIGUEIREDO, ERICK FROTA GOMES DINELLY, KELRY MAZUREGA OLIVEIRA RODRIGUES, MARIA GABRIELA DE ALMEIDA BRITO, MARCELO MOURÃO, MARIA PAULA GOMES PIVOTO JOÃO, GUILHERME AUGUSTO HAJJAR, LUDHMILA ABRAHÃO BASSAT, QUIQUE ROMERO, GUSTAVO ADOLFO SIERRA NAVECA, FELIPE GOMES VASCONCELOS, HELINE LIRA TAVARES, MICHEL DE ARAÚJO BRITO-SOUSA, JOSÉ DIEGO, et al. ; Methylprednisolone as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized With COVID-19 (Metcovid): A Randomised, Double-Blind, Phase IIb, Placebo-Controlled Trial. *CLINICAL INFECTIOUS DISEASES*, v. 1, p. 1, 2020.