

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ANTÍGENOS CANDIDATOS À VACINA CONTRA AS FORMAS SANGUÍNEAS DE
PLASMODIUM VIVAX: AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE LONGA
DURAÇÃO**

por

Ana Luiza de Oliveira Melo

Belo Horizonte

2016

DISSERTAÇÃO MCS - CPqRR

A.L.O. MELO

2016

ANA LUIZA DE OLIVEIRA MELO

**ANTÍGENOS CANDIDATOS À VACINA CONTRA AS FORMAS SANGUÍNEAS DE
PLASMODIUM VIVAX: AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE LONGA
DURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Coorientação: Dra. Flora Satiko Kano

Belo Horizonte

2016

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M528a Melo, Ana Luiza de Oliveira.
2016

Antígenos candidatos à vacina contra as formas sanguíneas de *Plasmodium vivax*: avaliação da memória imunológica de longa duração / Ana Luiza de Oliveira Melo. – Belo Horizonte, 2016.

XV, 61 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 61 - 72

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Malária Vivax/imunologia 2. *Plasmodium vivax*/parasitologia 3. Vacinas/imunologia I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III. Kano, Flora Satiko (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

ANA LUIZA DE OLIVEIRA MELO

**ANTÍGENOS CANDIDATOS À VACINA CONTRA AS FORMAS SANGUÍNEAS DE
PLASMODIUM VIVAX: AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE LONGA
DURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luzia Helena Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ) Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Jacqueline Araújo Fiuza (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Lílian Lacerda Bueno (UFMG) Titular

Prof. Dr. Marcilene Rezende Silva (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 31/05/2016

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio incondicional. Aos mestres que passaram pela minha vida por terem dedicado seu tempo ao meu crescimento pessoal e profissional e a todos que contribuíram para sua realização. Especialmente, dedico aos voluntários aqui estudados, pois, sem sua colaboração, nada mais haveria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Luzia Helena Carvalho, pela possibilidade de realizar este trabalho e por todas as oportunidades de aprendizado. Sua disponibilidade foi fundamental na trajetória trilhada. Agradeço também à Dra. Flora Satiko Kano pela presteza em ajudar sempre que necessário e pelas infinitas contribuições.

À Isabela Cerávolo e ao Bruno Sanchez por terem dado início a este estudo, 12 anos atrás.

À Bárbara pela colaboração infundável, pelas horas juntas na capela, por todos os tubos de sangue e histopaque vertidos e por todos os ELISAs. Também à toda equipe do laboratório, em especial a todos que me ajudaram de uma forma ou de outra, Jéssica, Letícia, Daniel, Ana Carolina, Danielle, Vanessa, Gabriela, Michelle, Raianna. Seja doando sangue, dando aquele apoio moral, compartilhando seu conhecimento, vocês foram indispensáveis.

Aos amigos queridos que me deram todo suporte emocional, Aracele, Denise, Gabriel, Lara, Camila, Sarah, obrigada por terem me ouvido e aconselhado sempre. Agradeço também à Mika, pelo carinho constante e por ter-me ensinado a respeitar a necessidade dos outros.

Aos amigos família que tive a chance de descobrir ao longo da vida, Thabata, Gabi, Raíssa, Luscher, Renatinha, André, Henrique, Carol, pelo amor e compreensão nos momentos da tormenta e pela alegria nos momentos de descontração. À toda turma do pré-UFMG, não cabe aqui o detalhamento, mas vocês sabem o quanto são especiais.

Aos amigos do LAR que sempre se fazem presentes, por meio de um abraço, uma palavra de carinho, uma piada infame. Vocês são a melhor equipe que já existiu.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oferta deste curso com tanta qualidade.

À Biblioteca do CPqRR, pelo acesso gratuito à informação técnico-científica, sustentada por recursos públicos federais.

Às minhas irmãs Nathália e Marina, por se dedicarem com tanto afinho ao meu bem estar e se doarem com tudo o que têm. Eu me tornei um ser humano melhor graças a vocês. À minha mãe, mulher guerreira, que me ensinou os meus valores e me deu a segurança para experimentar meus sonhos. Ao meu pai por se dar de coração à minha vida, me ensinando o que é amor incondicional, além de ser modelo diário de firmeza de caráter e corretude.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e ao CPqRR/FIOCRUZ.

RESUMO

A invasão dos eritrócitos pelos parasitos da malária garante o sucesso da infecção humana e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença clínica. Desse modo, existe grande interesse no desenvolvimento de vacinas que possam induzir anticorpos que bloqueiem o ciclo sanguíneo do parasito. No caso de *Plasmodium vivax*, o principal antígeno candidato à vacina é a *Duffy binding protein II* (DBPII), único ligante conhecido para a invasão dos eritrócitos humanos. Embora anticorpos naturalmente adquiridos contra a DBPII induzam proteção, faz-se necessário avaliar se esta resposta gera memória imunológica de longa duração. O trabalho aqui desenvolvido teve como objetivo principal avaliar se a DBPII e outros antígenos candidatos à vacina contra *P. vivax* induzem resposta imune humoral (anticorpos e células B de memória, MBCs) de longa-duração. A população de estudo foi constituída de indivíduos com história de exposição única a *P. vivax*, ocorrida em 2003, durante um surto de transmissão autóctone na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. Para tal, foram selecionados indivíduos que se infectaram (casos, n=13) ou não (não-casos, n=12) durante o período de transmissão. Como controle negativo, foram incluídos indivíduos nunca expostos à malária (BH, n=9). A resposta de anticorpos foi avaliada pela sorologia convencional (ELISA) utilizando como antígenos diferentes variantes da DBPII (Acre1 e Sal1) bem como outros antígenos candidatos à vacina (MSP1₁₉ e EBP2). A resposta de células B de memória para os mesmos antígenos foi avaliada pelo ensaio imunoenzimático que detecta MBCs diferenciadas em células secretoras de anticorpos IgG (ELISpot). Após padronizar o ensaio de ELISpot com sucesso, os nossos resultados demonstram que: (1) MBCs antígeno-específicas de vida-longa (12 anos após exposição) foram detectadas em todos os indivíduos do grupo caso e em parte dos indivíduos não-casos (58%), o que sugere que infecções assintomáticas podem ter ocorrido na época do surto; (2) a resposta celular de DBPII foi variante-específica, sendo a variante Acre1 (frequente na Amazônia brasileira) a mais imunogênica. Neste contexto, a cepa de referência Sal1 ou um antígeno sintético desta cepa (DEKnull) apresentaram pouca ou nenhuma imunogenicidade; (3) a MSP1₁₉, presente na superfície do parasito, foi o antígeno mais imunogênico, seguido da EBP2, proteína recém-descrita em *P. vivax*; (4) em relação a sorologia convencional, anticorpos IgG para os diferentes antígenos testados não perduraram após 12 anos de exposição única a *P. vivax*. Em conjunto, os resultados aqui apresentados permitiram concluir que uma única e breve exposição a *P. vivax* é capaz de induzir MBCs antígeno-específicas de vida longa, reforçando a importância de se estudar estas células na avaliação da memória imunológica da malária, particularmente, aquela induzida por antígenos candidatos à vacina.

Palavras-chave: memória imunológica, *P. vivax*, células B, vacina.

ABSTRACT

Erythrocyte invasion by malaria parasites is a key event in ensuring human infection and clinical development of the disease. Therefore, there is great interest in generating blocking antibodies through a blood-stage vaccine, preventing erythrocyte invasion. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein region II (DBP-II) is the only known ligand for human reticulocyte invasion, hence being an attractive vaccine candidate against asexual blood-stage *P. vivax*. Although there is evidence that naturally acquired anti-DBP-II antibodies induce protection, it is necessary to assess if this response produces sustained long-lasting immunological memory. Thereafter, the present work aimed to evaluate whether DBP-II and other *P. vivax* vaccine candidates induce long-lasting humoral immune response (antibodies and memory B cells, MBCs). For this purpose, we studied a population with a single *P. vivax* exposure in 2003, during an autochthonous outbreak in Minas Gerais state, a non-endemic area of Brazil. We selected 25 individuals exposed to the outbreak being 13 with confirmed *P. vivax* infection (cases) and 12 who had not been diagnosed with malaria (non-cases). As negative control, were included 9 individuals never exposed to malaria (residents in Belo Horizonte). Antibody responses to *P. vivax* blood antigens were evaluated by conventional serology (ELISA), focusing on two DBP-II variants (Acre1 e Sal1) and other vaccine candidates (MSP1₁₉ e EBP2). B cell memory responses to the same antigens were evaluated through Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot) targeting IgG secreting cells. After establishment of the ELISpot assay, our results showed that: (1) long-lasting antigen-specific MBCs were detected 12 years after exposure in all of the cases and in part of the non-cases (58%), which suggests the occurrence of asymptomatic infections during the outbreak; (2) cellular response to DBP-II was variant-specific, with greater immunogenicity of variant Acre1 (most frequent in the Amazon region). Regarding cellular response, the reference strain Sal1 and the synthetic construct (DEKnull) showed low or absence of immunogenicity; (3) MSP1₁₉, present in the parasite's surface, was highly immunogenic, followed by EBP2, *P. vivax*'s new predicted protein; (4) regarding conventional serology, IgG antibody responses to the different antigens here tested did not last after 12 years of exposure to *P. vivax*. Altogether our results showed that a single brief exposure to *P. vivax* is able to induce antigen-specific long-lasting MBCs, reinforcing the importance of these cells in accessing immunological memory in malaria, particularly, that induced by vaccine candidates.

Keywords: immunological memory, *P. vivax*, B cells, vaccine.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Mapa da região metropolitana de Belo Horizonte indicando a localização de Souza, município de Rio Manso, onde foi registrado o surto em 2003 | 32 |
| Figura 2: Ilustração esquemática do princípio do ensaio de ELISpot de IgG antígeno-específico e IgG total | 38 |
| Figura 3: Comparação de dois protocolos de ativação policlonal de células B de memória (MBCs) circulantes | 41 |
| Figura 4: Padronização das condições ideais para o ensaio imunoenzimático (ELISpot) para células B de memória | 42 |
| Figura 5: Padronização do ensaio de ELISpot para células secretoras de IgG inespecífica e antígeno-específica obtidas após estímulo | 43 |
| Figura 6: Resposta de células B de memória DBP _{II} específicas após infecção (caso) ou exposição (não-caso) única a <i>P. vivax</i> , durante surto de transmissão autóctone ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Souza, Distrito de Rio Manso, 2003 | 46 |
| Figura 7: Resposta de células B de memória específicas para antígenos sanguíneos após infecção (caso) ou exposição (não-caso) única a <i>P. vivax</i> , durante surto de transmissão autóctone ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Souza, Distrito de Rio Manso, 2003) | 48 |
| Figura 8: Resposta individual de células B antígeno-específicas nos indivíduos dos grupos caso, não-caso e controle | 50 |
| Figura 9: Reatividade do plasma para diferentes antígenos de forma sanguínea de <i>P. vivax</i> em indivíduos diagnosticados para malária (caso) em surto autóctone ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Souza, Distrito de Rio Manso, Minas Gerais) | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Principais condições testadas para cada um dos dois protocolos de ativação das células B de memória (MBCs) circulantes em células secretoras de anticorpos (ASCs) | 40 |
| Tabela 2: Resumo das condições padronizadas para detecção de células secretoras de anticorpos a partir da diferenciação das células B de memória circulantes | 44 |
| Tabela 3: Proporção de ASCs antígeno-específicas para diferentes construções da DBPII nos grupos caso, não-caso e controle não exposto .. | 46 |
| Tabela 4: Proporção de ASCs antígeno-específicas para proteínas da fase sanguínea nos grupos caso, não-caso e controle não exposto | 49 |
| Tabela 5: Aminoácidos variantes na região II da Duffy binding protein (DBPII) nas diferentes variantes analisadas no estudo | 57 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Acre1** – Variante de DBPII de *P. vivax* isolada no Acre (Sousa et al., 2014)
- ALP** – Enzima fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase*)
- AMA1** - Antígeno 1 de membrana apical (*Apical membrane antigen 1*)
- ASCs** – Células secretoras de anticorpos (*antibody secreting cells*)
- BCIP/NBT** - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato com nitroazul de tetrazólio (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium)
- CPG ODN-2006** – Oligonucleotídeo CpG sintético
- CPqRR** – Centro de Pesquisas René Rachou
- DARC** - Antígeno do grupo sanguíneo Duffy/DARC; receptor para quimiocinas (*Duffy Antigen Receptor for chemokines*)
- DBL** - Domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*Duffy binding like domain*)
- DBP** - Proteína de ligação ao eritrócito (*Duffy binding protein*)
- DBPII** - Região II da *Duffy binding protein* de *P. vivax*
- DEKnull** – Proteína DBPII mutada com domínio variável (DEK) ausente
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- DO** – Densidade ótica
- EBP** – Proteína de ligação aos eritrócitos (*Erythrocyte binding protein*)
- EBP2** – Proteína de ligação aos eritrócitos 2, proteína predita para *P. vivax* (Hester et al., 2013)
- ELISA** - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ELISpot** – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*)
- Fiocruz** – Fundação Oswaldo Cruz
- HEPES** - 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
- IgG** – Imunoglobulina da classe G
- IL-2** – Interleucina 2
- IL-10** – Interleucina 10
- IR** – Índice de reatividade
- MBCs** – Células B de memória (*memory B cells*)
- MSP1₁₉** – Porção de 19 kDa da proteína 1 de superfície do merozoíto

OPD - dicloridrato de o-fenilenodiamina (*o-Phenylenediamine dihydrochloride*)

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells*)

PBS – Tampão fosfato salino (*phosphate saline buffer*)

PBST - Tampão fosfato salino acrescido de Tween 20

PWM – Lectina de *Phytolacca americana* (*Pokeweed mitogen*)

PvDBP - Proteína de ligação ao eritrócito de *P. vivax* (*P. vivax Duffy binding protein*)

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

RPMI – Meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute (*Roswell Park Memorial Institute medium*)

SAC – Proteína A de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan

SBF – Soro bovino fetal

TCD4⁺ - Linfócitos T auxiliares (*T helper lymphocyte*)

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TLR – Receptor do tipo Toll (*Toll-like receptor*)

Tween 20 – Polissorbato 20

Sal1 - Variante de DBPII de *P. vivax* de um clone de referência de laboratório isolado em El Salvador (Fang et al., 1991)

SES-MG – Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 A malária no Brasil e no Mundo | 16 |
| 1.2 Malária na região extra-Amazônica | 16 |
| 1.3 Ciclo biológico dos plasmódios humanos no hospedeiro vertebrado | 18 |
| 1.4 Resposta imune naturalmente adquirida contra a malária | 19 |
| 1.5 Resposta imune humoral contra as formas sanguíneas de <i>P. vivax</i> : principais alvos vacinais | 21 |
| 1.5.1 <i>Duffy binding protein II</i> (DBPII) de <i>P. vivax</i> | 22 |
| 1.5.2 Outros alvos vacinais de interesse em <i>P. vivax</i> | 24 |
| 1.5.3 Longevidade da resposta de anticorpos e células B de memória (MBCs) na malária causada por <i>P. vivax</i> | 26 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 28 |
| 3 OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 Objetivo geral | 31 |
| 3.2 Objetivos específicos | 31 |
| 4 METODOLOGIA | 32 |
| 4.1 Área de estudo, voluntários e coleta de sangue | 32 |
| 4.2 Proteínas recombinantes | 34 |
| 4.2.1 Proteína ligante de Duffy de <i>P. vivax</i> (DBPII) | 34 |
| 4.2.2 Proteína de superfície do merozoíto 1 de <i>P. vivax</i> (MSP1) | 34 |
| 4.2.3 Proteína ligante do eritrócito de <i>P. vivax</i> (EBP2) | 34 |
| 4.3 Processamento das amostras de sangue: obtenção de plasma e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) | 35 |
| 4.4 Cultura das PBMCs e ativação policlonal das células B de memória circulantes | 35 |
| 4.5 Ensaio imunoenzimático (ELISpot) para detecção de células B secretoras de anticorpos específicos para DBPII, DEKnull, MSP1 ₁₉ e EBP2 | 36 |
| 4.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti- | |

| | |
|---|----|
| DBPII, anti-MSP1 ₁₉ e anti-EBP2 | 38 |
| 4.7 Análises Estatísticas | 39 |
| 5 RESULTADOS | 40 |
| 5.1 Padronização dos protocolos de ativação policlonal das células B de memória circulantes | 40 |
| 5.2 Padronização das condições ideais para o ensaio imunoenzimático (ELISpot) para células B de memória | 42 |
| 5.3 Detecção de células B de memória antígeno-específicas após infecção (caso) ou exposição (não-caso) única a <i>P. vivax</i> , ocorrida em 2003 | 45 |
| 5.4 Resposta de anticorpos IgG específicos para <i>P. vivax</i> após infecção única por <i>P. vivax</i> , ocorrida em 2003 | 50 |
| 6 DISCUSSÃO | 52 |
| 6.1 Estímulo policlonal <i>in vitro</i> para a diferenciação de células B de memória (MBCs) circulantes em células secretoras de IgG (ASCs) detectadas pelo ELISpot | 52 |
| 6.2 Persistência de MBCs antígeno-específicas 12 anos após exposição única a <i>P. vivax</i> | 54 |
| 6.3 Ausência de resposta de anticorpos anti- <i>P. vivax</i> após 12 anos de exposição única ao parasito | 58 |
| 7 CONCLUSÕES | 60 |
| REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA | 61 |
| ANEXOS | 73 |
| Anexo 1 Questionário aplicado aos indivíduos participantes do estudo | 73 |
| Anexo 2 Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes do estudo | 74 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária no Brasil e no mundo

A malária é uma das principais doenças parasitárias e constitui um grande desafio para as autoridades em saúde pública no mundo. Em 2015 foram registrados 214 milhões de casos no mundo, representando uma queda de 18% dos 262 milhões de casos previstos em 2000 (WHO, 2015).

No Brasil, em 2015, foram registrados cerca de 150.000 casos da doença (Secretaria de Vigilância em Saúde, SVS, 2015), sendo a quase totalidade deles proveniente da região da Amazônia Legal, que abrange os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Apesar de elevado, este número representa uma queda de quase 75% nos casos de malária que vinham sendo registrados no país (WHO, 2015).

A queda nos casos de malária no Brasil e no mundo tem sido reflexo da nova estratégia mundial de controle da doença, que mudou o foco do controle vetorial para o controle de casos clínicos, priorizando diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes (Lapouble *et al.*, 2015). Apesar disto, a malária permanece um desafio na Amazônia brasileira, particularmente com a expansão de parasitos resistentes aos antimaláricos, com o êxodo rural e urbanização descontrolada (Sampaio *et al.*, 2015). De relevância, tem sido os casos de malária na região extra-Amazônica, sejam os casos importados ou de transmissão autóctone, sendo os últimos favorecidos pela presença do mosquito vetor em todo o território nacional e pelo intenso fluxo migratório entre áreas endêmicas e não endêmicas (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).

1.2 Malária na região extra-Amazônica

A região extra-Amazônica, composta por 17 estados e o Distrito Federal, registrou, em 2014, cerca de 600 novos casos da doença, incluindo casos importados e de transmissão autóctone (SVS, 2015). Entre os casos importados, incluem-se casos da Amazônia bem como de outros países onde a doença é endêmica, como é o caso dos países do continente africano. Por outro lado, a presença de mosquitos vetores faz com que casos de transmissão autóctone

possam ocorrer em todo o território nacional, incluindo no estado de Minas Gerais (Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, SES-MG, 2008).

Apenas em Minas Gerais, 709 casos de malária foram registrados no período entre 2007 e 2012 (SES-MG, 2013). Já foram descritos focos de transmissão autóctone em diversas cidades do estado, como Montalvânia, Mantena, Uberlândia, Monte Alegre (Fontes *et al.*, 1991; Limongi *et al.*, 2008; Pina-Costa *et al.*, 2014; Lorenz *et al.*, 2015). Neste contexto, de relevância foi a ocorrência, em 2003, de um surto de transmissão autóctone de *P. vivax* na região metropolitana de Belo Horizonte (Ceravolo *et al.*, 2009). De acordo com a Secretaria de Saúde de Minas Gerais, o surto foi iniciado quando um residente da comunidade retornou da Amazônia infectado com *P. vivax* (Cerbino *et al.*, 2004). A presença de pessoas susceptíveis, a elevada densidade de anofelinos, bem como a demora no diagnóstico fez com que 25 casos autóctones fossem registrados na ocasião (Zumpano *et al.*, 2004).

De modo semelhante, mais recentemente, tem sido registrado um grande número de casos de malária autóctone nas regiões de Mata Atlântica (Miguel *et al.*, 2014). Pouco se conhece ainda sobre os fatores envolvidos na transmissão de malária na região de Mata Atlântica, mas os estudos recentes, incluindo do nosso grupo de pesquisa, têm sugerido que as espécies simianas de *Plasmodium* poderiam ser responsáveis pelos casos humanos (de Alvarenga *et al.*, 2015). Estes dados reforçam a importância da vigilância epidemiológica na região extra-amazônica, uma vez que se estima que somente 19% de todos os casos extra-amazônicos sejam diagnosticados e tratados nas primeiras 48 h após aparecimento dos sintomas (Pina-Costa *et al.*, 2014). Esse quadro se deve à dificuldade de diagnóstico nas regiões em que a incidência da doença é baixa, uma vez que há falta de profissionais treinados capazes de reconhecer e realizar diagnóstico laboratorial adequado. Especialmente nas regiões em que se têm surtos anuais de dengue, onde a probabilidade de se identificar um paciente febril com malária é reduzida consideravelmente (Lupi *et al.*, 2004). A falha diagnóstica é preocupante, uma vez que a chance de óbito é 80 vezes maior nos casos de malária importada (dos Santos *et al.*, 2014).

1.3 Ciclo biológico dos plasmódios humanos no hospedeiro vertebrado

Em geral, cinco espécies de *Plasmodium* são capazes de causar malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Entre estas espécies, *P. vivax* é a espécie mais prevalente fora da África (Qi *et al.*, 2012) e a responsável por 84% dos casos notificados no Brasil em 2014 (WHO, 2015).

O ciclo biológico dos parasitos da malária humana compreende duas fases distintas: a fase sexuada, que ocorre em fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, e a fase assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado. A infecção do hospedeiro vertebrado se dá quando os esporozoítos, forma infectantes, são inoculados pelos mosquitos vetores durante o repasto sanguíneo das fêmeas de *Anopheles*; os parasitos são depositados na pele do hospedeiro, podendo permanecer ali por várias horas ou dias até encontrar um vaso sanguíneo (Josling e Llinás, 2015). Uma vez na circulação, os esporozoítos migram para o fígado, onde infectam os hepatócitos. Os esporozoítos migram através de vários hepatócitos antes de finalmente se desenvolverem em seu interior (Mota e Rodrigues, 2002). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, uma sub-população dos parasitos pode permanecer em estado de latência no fígado, a essa forma latente, responsável pelos casos de recaída, se dá o nome hipnozoíto (Krotoski, 1985). Uma vez dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após sucessivas divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Os esquizontes maduros liberam os merozoítos por meio do brotamento de vesículas (merossomos), que liberam os merozoítos diretamente na corrente sanguínea (Sturm *et al.*, 2006).

Na circulação, os merozoítos invadem os eritrócitos por meio de interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores presentes na superfície da célula hospedeira (Petter e Duffy, 2015; Boyle *et al.*, 2013). No caso das espécies mais prevalentes, *P. vivax* e *P. falciparum*, as interações do tipo ligante-receptor têm sido mais bem estudadas. Enquanto estudos demonstram a capacidade de merozoítos de *P. falciparum* em invadir eritrócitos por diversas vias de invasão (Petter e Duffy, 2015), para *P. vivax* existe uma via de invasão predominante que envolve o antígeno de grupo sanguíneo Duffy/DARC (Miller *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1992). De fato, indivíduos DARC negativos são altamente refratários à infecção por *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976; Mendis *et al.*, 2001). Após várias gerações de merozoítos, alguns se diferenciam, dando origem a formas sexuadas, os

gametócitos masculinos e femininos, que amadurecem no sangue circulante sem sofrer divisão celular. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito vetor ingere os gametócitos, dando início à fase sexuada dos parasitos no hospedeiro invertebrado (Crompton *et al.*, 2014).

Dentro do estômago do mosquito, os gametócitos masculinos e femininos se diferenciam em gametas, sendo então capazes de se fundir para formação do zigoto (Barnwell e Galinski, 1998). Cerca de um dia após a fecundação, o zigoto, denominado oocineto, se desloca através das células epiteliais do intestino médio com movimentos ameboides. Após sua fixação entre o epitélio e a membrana basal, o oocineto passa a se chamar oocisto. Dentro do oocisto, inicia-se o processo de multiplicação esporogônica e, em aproximadamente duas semanas, sua parede se rompe, liberando os esporozoítos que invadem a hemolinfa do mosquito. Pela hemolinfa, os esporozoítos migram até as glândulas salivares, completando o ciclo de *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado (Josling e Llinás, 2015).

É durante a fase eritrocítica dos parasitos que ocorre a doença clínica na malária, o que reforça a importância de se entender a resposta imune do hospedeiro vertebrado dirigida aos estágios sanguíneos dos parasitos (Beeson *et al.*, 2016).

1.4 Resposta imune naturalmente adquirida contra a malária

Em áreas de elevada endemicidade para a malária, após sucessivos episódios clínicos da doença, observa-se diminuição no quadro clínico, com o desenvolvimento de uma imunidade protetora contra a doença clínica (Baird *et al.*, 1998). De fato, em áreas de alta transmissão, como é o caso de muitos países da África e da Ásia, crianças ainda na idade pré-escolar se tornam imunes às formas mais graves da malária, mas se mantêm ainda susceptíveis aos seus sintomas (Laishram *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 1999). Nas mesmas regiões, adultos com longo histórico de exposição à malária raramente apresentam episódios clínicos da doença, mas permanecem susceptíveis às infecções podendo apresentar um quadro de doença assintomática (Marsh e Kinyanjui, 2006).

Embora os mecanismos envolvidos na imunidade naturalmente adquirida na malária não estejam completamente esclarecidos (revisado por Mueller *et al.*, 2013), acredita-se que a lenta aquisição de imunidade se deva a diversos fatores, incluindo a complexidade do ciclo biológico no hospedeiro vertebrado, com diferentes estágios

evolutivos que induzem a imunidade espécie e estágio-específica, com a expressão de antígenos altamente polimórficos e variáveis na superfície dos eritrócitos infectados (Petter e Duffy, 2015; Jemmely *et al.* 2010; Cowman e Crabb, 2006).

Embora a imunidade naturalmente adquirida à malária tenha sido mais estudada para *P. falciparum*, achados mais recentes demonstram que o mesmo perfil de aquisição de imunidade é observado para *P. vivax* (Mueller *et al.*, 2013). É interessante destacar que estes estudos demonstram que, sob exposição constante e intensa ao parasito, a imunidade clínica para *P. vivax* é adquirida mais rapidamente do que para *P. falciparum*. De fato, enquanto crianças infectadas com *P. falciparum* permanecem sintomáticas até os 5 anos de idade, aquelas com *P. vivax* tem um declínio dos sintomas a partir do segundo ano de vida (Lin *et al.*, 2010; Michon *et al.*, 2007).

No Brasil, embora os níveis de transmissão de malária não sejam tão intensos quanto em áreas hiper e holoendêmicas, diferenças na aquisição de imunidade clínica têm sido descritas também entre *P. falciparum* e *P. vivax*. Mais especificamente, estudos realizados no Acre demonstraram que a incidência de malária causada por *P. vivax* caiu significativamente com a idade e em taxas mais rápidas do que em *P. falciparum* (da Silva-Nunes *et al.*, 2008). Corroborando com esses achados, estudos clássicos com infecção controlada de indivíduos durante a terapia com malária para o tratamento de neurosífilis mostraram que a imunidade a *P. vivax* é adquirida mais rapidamente do que para *P. falciparum* (Boyd, 1947). Naqueles estudos, as infecções sucessivas foram realizadas com cepas homólogas (Boyd, 1947) e heterólogas de *P. vivax* (Collins *et al.*, 2004), e os achados confirmaram que a imunidade desenvolvida era cepa-específica (Mueller *et al.*, 2013).

Um aspecto interessante do ciclo de *P. vivax* que poderia contribuir para a aquisição mais rápida da proteção é a presença dos hipnozoítos, isto é, parasitos hepáticos latentes (Krotoski, 1985), que poderiam ser ativados e reiniciar a infecção sanguínea, agindo como uma dose de reforço no desenvolvimento de resposta imune (White, 2011). Neste contexto, de interesse também é o mecanismo de invasão dos eritrócitos por *P. vivax*, altamente dependente do antígeno de grupo sanguíneo Duffy/DARC (Miller *et al.*, 1976) tornando a resposta de anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor altamente eficiente. Em contraste, as vias de invasão de *P. falciparum* são altamente redundantes (Mueller *et al.*, 2013).

Apesar dos mecanismos envolvidos na aquisição da imunidade protetora na malária serem ainda pouco conhecidos, já se sabe que os anticorpos presentes no sangue circulante têm papel fundamental nesta proteção (Longley *et al.*, 2016). De fato, a transferência passiva de anticorpos de adultos imunes para crianças não imunes protegeu essas crianças da doença clínica (Cohen *et al.*, 1961). Tal proteção foi confirmada em outro estudo independente, 30 anos após o primeiro (Sabchareon *et al.*, 1991). Enquanto a resposta imune a *P. falciparum* tem sido bem estudada (Marsh e Kinyanjui, 2006; Ryg-Cornejo *et al.*, 2015), aquela induzida por *P. vivax* é ainda negligenciada (Mueller *et al.*, 2013).

1.5 Resposta imune humoral contra as formas sanguíneas de *P. vivax*: principais alvos vacinais

Embora os anticorpos naturalmente adquiridos tenham um papel fundamental na resposta imune protetora à malária (Longley *et al.*, 2016), esta resposta é espécie e estágio específica. Assim, uma resposta imune dirigida contra os estágios infectantes (esporozoítos) não protege contra as formas sanguíneas e vice-versa (Richards e Beeson, 2009). Portanto, do ponto de vista de antígenos candidatos à vacina, tanto os estágios pré-eritrocíticos quanto os estágios sanguíneos são relevantes (Mueller *et al.*, 2015). Enquanto para os antígenos dos estágios pré-eritrocíticos a resposta celular é particularmente importante (Mueller *et al.*, 2013, 2015), existe certo consenso que os anticorpos são fundamentais para a resposta imune dirigida contra as formas sanguíneas dos parasitos, que têm como alvo antígenos dos merozoítos ou de superfície de eritrócitos infectados. Estes anticorpos parecem atuar por meio de diferentes mecanismos, tais como, inibição da invasão dos eritrócitos, neutralização, opsonização e inibição celular dependente de anticorpos (Beeson *et al.*, 2008; Longley *et al.*, 2016).

Conforme citado, evidências mais recentes demonstram que, no caso de *P. vivax*, a imunidade clínica é adquirida mais rapidamente do que para *P. falciparum* (Lin *et al.*, 2010; Senn *et al.*, 2012). Estes achados têm levado a comunidade científica a sugerir que existe maior possibilidade de se obter uma vacina eficaz contra este parasito (Mueller *et al.*, 2013). Devido à importância da resposta de anticorpos para a proteção contra as formas sanguíneas de *P. vivax*, diversos estudos de genômica e transcriptômica têm se voltado para a identificação de

possíveis antígenos envolvidos na resposta imune protetora contra as formas sanguíneas do parasito (Longley *et al.*, 2016). Até o momento, o antígeno mais promissor e que tem sido mais bem estudado é a *Duffy binding protein II* (DBPII) (revisto por Sousa *et al.*, 2014). A DBPII tem despertado interesse por participar da principal via de invasão do parasito nos eritrócitos (Wertheimer e Barnwell, 1989). De fato, a evidência mais direta de que anticorpos participam da proteção naturalmente adquirida contra *P. vivax* foi a demonstração de que os anticorpos anti-DBPII que bloqueiam a invasão do parasito aos eritrócitos estão envolvidos na proteção clínica de crianças expostas a *P. vivax* na Papua Nova Guiné (King *et al.*, 2008). Tais achados fazem com que a DBPII seja, atualmente, o principal candidato para uma vacina contra as formas sanguíneas de *P. vivax* (Mueller *et al.*, 2015).

1.5.1 *Duffy binding protein II* (DBPII) de *P. vivax*

A DBP faz parte da superfamília de proteínas de ligação ao eritrócito, EBP (*erythrocyte binding protein*), que é expressa durante o ciclo eritrocítico de *P. vivax*. A proteína pode ser dividida em sete regiões; no entanto, os estudos atuais de imunogenicidade estão focados na região II da DBP (DBPII), que corresponde ao domínio *Duffy binding like domain* (DBL), onde se encontra o sítio de ligação da proteína ao seu receptor nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, o antígeno de grupo sanguíneo/receptor de quimiocinas (DARC) (VanBuskirk *et al.*, 2004; Grimberg *et al.*, 2007; Ntumngia *et al.*, 2013, 2014).

Corroborando com seu potencial vacinal, diversos estudos demonstraram a presença de resposta imune anti-DBPII em indivíduos residentes em áreas de alta transmissão da malária (Michon *et al.*, 2000; Xainli *et al.*, 2002; King *et al.*, 2008). Adicionalmente, anticorpos produzidos por indivíduos naturalmente infectados são capazes de bloquear a ligação da DBP II, sendo que esta resposta aumenta em função dos níveis de transmissão de malária (Michon *et al.*, 2000). Assim, em áreas hiperendêmicas, como a Papua Nova Guiné, a resposta de anticorpos para DBPII é relativamente frequente (60-80%), atingindo um platô em indivíduos com mais de 15 anos de idade (Xainli *et al.*, 2002; Chootong *et al.*, 2012, 2014). De relevância, anticorpos naturalmente adquiridos contra a DBPII bloqueiam a invasão do parasito na célula hospedeira e estão envolvidos na proteção clínica (King *et al.*, 2008).

No Brasil, nosso grupo de pesquisa em malária tem conduzido um estudo pioneiro para caracterizar a resposta imune a DBP-II em indivíduos naturalmente expostos à malária na Amazônia brasileira (revisado por Sousa *et al.*, 2014). Estes estudos permitiram demonstrar que esta proteína é naturalmente imunogênica nas áreas endêmicas brasileiras e que a frequência de anticorpos anti-DBP-II aumenta com a exposição à malária (Ceravolo *et al.*, 2005). De fato, o grupo demonstrou que a probabilidade de anticorpos IgG anti-DBP-II aumenta em 2% por ano de exposição ao parasito (Souza-Silva *et al.*, 2010). Estudos de corte transversal ou longitudinal permitiram demonstrar ainda que esta resposta inclui anticorpos capazes de bloquear a interação do ligante do parasito (DBP-II) com o seu receptor DARC presente na superfície dos eritrócitos (Ceravolo *et al.*, 2008; Kano *et al.*, 2012).

Apesar da importância da DBP-II, a região do ligante da proteína com seu receptor é altamente polimórfica (Xainli *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2006) e, de fato, nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a demonstrar que a resposta a DBP-II induz imunidade variante-específica (Ceravolo *et al.*, 2009). Posteriormente, estes achados foram confirmados por outros autores (Cole-Tobian *et al.*, 2009), reforçando a hipótese de que uma vacina contra a DBP-II pode ser complicada devido a indução de uma imunidade do tipo isolado-específica (Sousa *et al.*, 2010; 2014). Apesar desta limitação, nosso grupo de pesquisa e outros já identificaram que alguns indivíduos expostos à malária, denominados respondedores de elite, podem desenvolver uma imunidade de longa duração que transcende a variante do parasito (Souza-Silva *et al.*, 2014; Chootong *et al.*, 2010). Estes achados têm estimulado a busca dos epítopos da DBP-II envolvidos nesta resposta protetora que parece induzir resposta imune de longa duração.

No intuito de se obter uma resposta de anticorpos anti-DBP-II mais abrangente, sem a interferência dos polimorfismos presentes nas diferentes variantes de *P. vivax*, diferentes construções vacinais têm sido sugeridas (Ntumngia e Adams, 2012). Entre os protótipos vacinais desenvolvidos inclui-se uma DBP-II sintética, denominada DEKnull, na qual o epítipo polimórfico está ausente (Ntumngia e Adams, 2012). Embora a remoção do epítipo variável diminua a imunogenicidade da DBP-II, camundongos imunizados com a DEKnull produziram anticorpos inibitórios anti-DBP-II direcionados para regiões mais conservadas da proteína (Ntumngia *et al.*, 2013). Portanto, a proteína sintética parece ser capaz de produzir anticorpos que transcendem a especificidade da resposta imune induzida

pela DBPII. Assim, fazem se necessários estudos em populações humanas para saber se, em infecções naturais, há a produção de anticorpos direcionados para a região conservada da proteína e qual a longevidade destes anticorpos.

1.5.2 Outros alvos vacinais de interesse em *P. vivax*

Apesar da importância da DBPII como antígeno candidato a vacina, outras proteínas do estágio sanguíneo de *P. vivax* também têm sido alvo de estudos. Entre estes, o antígeno melhor estudado é o fragmento C-terminal de 19 kDa da proteína principal de superfície dos merozoítos (MSP1₁₉), que é produzido após sucessivas clivagens da proteína principal durante as esquizogonias sanguíneas (Morgan *et al.*, 1999). A função exata da proteína é desconhecida, mas há evidências que apontam para seu envolvimento na invasão dos eritrócitos, pois anticorpos anti-MSP1₁₉ presentes no soro de indivíduos infectados são capazes de inibir a invasão (O'Donnell *et al.*, 2001), bem como inibir o processamento da proteína majoritária (Lazarou *et al.*, 2009). Corroborando com seu possível uso no desenvolvimento de vacinas para *P. vivax*, estudos realizados em áreas de baixa transmissão da Tailândia demonstraram que a proteína é capaz de gerar anticorpos de vida longa e células B de memória (Wipasa *et al.*, 2010). Apesar disto, o estudo tailandês não encontrou associação entre a presença de anticorpos e proteção. Outros estudos também já demonstraram a presença de anticorpos anti-MSP1₁₉ após vários anos na ausência de reinfecção pelo parasito (Braga *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2004). Embora diferentes construções vacinais envolvendo a MSP1₁₉ tenham sido elaboradas (Bargieri *et al.*, 2010), a presença de anticorpos anti-MSP1₁₉ parece ser um bom preditor de exposição à malária, uma vez que a maioria dos indivíduos expostos desenvolvem anticorpos contra esta proteína, incluindo aqueles com história de exposição única ao parasito (Ceravolo *et al.*, 2009)

Outra proteína identificada pelo seu papel na invasão do eritrócito é o antígeno apical de membrana 1 (AMA-1). A proteína AMA-1, que parece ser essencial no processo de invasão dos gêneros *Plasmodium* e *Toxoplasma*, é uma proteína pertencente à família de proteínas transmembrana do tipo 1 e se origina nos micronemas (Tyler *et al.*, 2011). Tem sido alvo para desenvolvimento de vacinas devido a estudos que demonstraram o reconhecimento da AMA-1 recombinante por

anticorpos induzidos em infecções naturais por *P. vivax* (Rodrigues *et al.*, 2005). Corroborando para seu uso vacinal, foi recentemente identificado um epitopo linear de células B altamente antigênico em populações naturalmente infectadas no Brasil (Bueno *et al.*, 2011). De fato, a imunização de animais com a AMA-1 de *P. vivax* recombinante levou à produção de anticorpos capazes de inibir a invasão do eritrócito *in vitro* (Vicentin *et al.*, 2014), reforçando sua importância enquanto candidato vacinal para *P. vivax*. Entretanto, ensaios clínicos sugeriram que esta proteína também induz imunidade cepa-específica (Thera *et al.*, 2011; revisto por Heppner *et al.*, 2013).

Mais recentemente, a comparação entre sequências genômicas de isolados de campo de *P. vivax* do Camboja e da cepa de referência Salvador I (Sal1) revelou várias sequências de DNA ausentes na sequência genômica de referência, bem como genes codificadores de novas proteínas em potencial (Hester *et al.*, 2013). Entre as sequências, foi identificada uma proteína hipotética contendo um domínio *Duffy binding like* (DBL), assim como a DBP, fazendo crer que tal proteína esteja envolvida no processo de invasão dos eritrócitos (Hester *et al.*, 2013). Por possuir todas as características necessárias a uma proteína de ligação ao eritrócito (EBP) (Adams *et al.*, 1992), a nova proteína foi denominada EBP 2 e classificada como parte dessa superfamília de proteínas (Hester *et al.*, 2013). A EBP 2 pode ser capaz de interagir com os eritrócitos humanos e constitui um forte candidato a participar da invasão dos eritrócitos por *P. vivax* (Ntumngia, Torres *et al.*, dados não publicados). Apesar disso, análises filogenéticas preliminares sugerem que essa proteína seja diferente das demais DBPs descritas, fazendo-se necessários estudos com a mesma no intuito de melhor entender sua função bem como sua resposta imune.

No entanto, embora exista um consenso sobre a importância dos anticorpos na proteção contra a malária, o mesmo não acontece com relação à duração destes anticorpos e pouco se sabe ainda sobre a geração de células B de memória (MBCs), particularmente as MBCs específicas em resposta aos antígenos de *P. vivax*. De modo geral, contrário ao que se observa para os anticorpos circulantes, que podem cair para níveis indetectáveis na ausência do antígeno, as células B de memória (MBCs) apresentam vida longa (Corcoran e Tarlinton, 2016; Jones *et al.*, 2015).

1.5.3 Longevidade da resposta de anticorpos e células B de memória (MBCs) na malária causada por *P. vivax*

Na literatura, os achados acerca da duração da resposta de anticorpos na malária são contrastantes, havendo evidências a favor e contra a resposta de anticorpos de longa duração (Fowkes *et al.*, 2016). Entretanto, do ponto de vista das vacinas em desenvolvimento, faz-se altamente relevante estudar se os antígenos candidatos induzem uma resposta humoral de longa duração e, ainda, se esta resposta se mantém na ausência de reinfecção. Isto é importante tendo em vista que os níveis de transmissão da malária tendem a cair significativamente nos próximos anos (Fowkes *et al.*, 2016).

Ainda há muitas lacunas no conhecimento acerca da geração de resposta de memória para malária e muito do que se sabe vem de estudos com a espécie mais patogênica, *P. falciparum* (Langhorne *et al.*, 2008). No caso de *P. falciparum*, os achados apontam para a importância da preimunização, onde a exposição constante ao antígeno se faz necessária para que haja manutenção da resposta de anticorpos (Smith *et al.*, 1999). No entanto, achados da literatura reforçam a ideia de que, pelo menos na infecção por *P. falciparum*, a presença de MBCs antígeno-específicas em adultos pode persistir na ausência de reexposição (Migot *et al.*, 1993). Inclusive, achados recentes de Ndungu e colaboradores (2012) com indivíduos do Quênia reforçam estes dados e demonstram que, apesar da queda significativa no título de anticorpos anti-*P. falciparum* existe indução de MBCs específicas e essas células se mantêm em frequências relativamente constantes na ausência de reexposição ao parasito (Ndungu *et al.*, 2012). De interesse, houve manutenção de MBCs específicas para *P. falciparum* em residentes suíços até 16 anos após seu retorno da área endêmica (Ndungu *et al.*, 2013), o que sugere que a avaliação de células B de memória parece ser mais apropriada na avaliação da resposta humoral ao parasito do que a dosagem de anticorpos específicos.

Na malária, apesar do grande interesse em uma vacina capaz de induzir MBCs e/ou células plasmáticas de vida longa, os mecanismos envolvidos na geração de resposta de longa duração antígeno-específica ainda não estão claros (Longley *et al.*, 2016). No caso de *P. vivax* poucos são os estudos nesta direção, sendo a maior parte deles relacionados à resposta celular, particularmente de células TCD4⁺ (Jangpatarapongsa *et al.*, 2006; Bouillet *et al.*, 2011; Salwati *et al.*, 2011). De fato, a falta de estudos em *P. vivax*, quando comparado a *P. falciparum*, é preocupante, tendo em vista que existem aspectos da biologia e do ciclo de vida de *P. vivax* que não são compartilhados com *P. falciparum* (Galinski *et al.*, 2013). Apesar disto, os dados disponíveis sugerem que *P. vivax* também é capaz de induzir resposta de anticorpos de longa duração, incluindo MBCs antígeno específicas (Wipasa *et al.*, 2010). Portanto, a avaliação de células B de memória na malária causada por *P. vivax* se faz de extrema importância, particularmente, no que diz respeito aos antígenos vacinais. Neste contexto, faz-se necessário avaliar esta resposta em indivíduos com histórico de infecção única pelo parasito, uma vez que determinar a longevidade na ausência de um reforço imunológico será importante em áreas com baixos níveis de transmissão da doença, como é o caso da Amazônia brasileira.

2 JUSTIFICATIVA

A transmissão da malária no Brasil se concentra na Região Amazônica, responsável pela quase totalidade dos casos registrados no país (SVS, 2015). Predominantemente, observam-se infecções causadas por *Plasmodium vivax*, parasito responsável por cerca de 80% dos casos notificados (WHO, 2015). Como resultado das iniciativas de controle da malária, o Brasil registrou 143.415 casos da doença em 2015 sendo este o menor número dos últimos 35 anos (SVS, 2015). Mas, apesar da redução, a doença ainda constitui um desafio para a saúde pública no país.

Os parasitos do gênero *Plasmodium* possuem diversos estágios evolutivos no hospedeiro vertebrado, no entanto, os anticorpos contra as formas sanguíneas são altamente relevantes uma vez que estes estágios do parasito são os responsáveis pelos sintomas clínicos da doença (Mueller *et al.*, 2013). Desse modo, há grande interesse no desenvolvimento de uma vacina contra as formas sanguíneas, que possa ser direcionada para antígenos que sejam expressos pelo merozoíto, estágio do parasito que invade os eritrócitos (revisto por Richards e Beeson, 2009; Beeson *et al.*, 2016).

No caso de *P. vivax*, a invasão aos eritrócitos é mediada pela *Duffy binding protein II* (DBPII), proteína de micronema que se liga a um receptor na superfície dos eritrócitos, o antígeno de grupo sanguíneo DARC (Horuk *et al.*, 1993). Como a via de invasão DBPII-DARC é a única descrita para *P. vivax*, a DBPII tem sido considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de vacinas contra os estágios sanguíneos do parasito (VanBuskirk *et al.*, 2004). Neste contexto, o nosso grupo de pesquisa vem estudando há vários anos a resposta imune contra a DBPII, particularmente, em populações expostas à malária no Brasil (revisto por Sousa *et al.*, 2014). Estes estudos permitiram (1) caracterizar os principais alelos de DBPII circulantes na Amazônia e demonstrar que a recombinação genética desempenha um papel importante na diversidade haplotípica da DBPII (Sousa *et al.*, 2010); (2) demonstrar pela primeira vez que os anticorpos inibitórios (BIAbs DBPII) são alelo-específicos (Ceravolo *et al.*, 2009); e (3) conduzir estudos longitudinais para avaliar os fatores que influenciam na presença e persistência da resposta humoral (Kano *et al.*, 2012; Souza-Silva *et al.*, 2014). Embora a imunidade contra a DBPII seja cepa-específica, a possibilidade de ser de longa-duração tem estimulado diferentes

grupos de pesquisa, incluindo o nosso, a caracterizar melhor a duração desta imunidade. Assim, parte deste estudo objetivou avaliar a persistência da resposta após anos de exposição a um episódio de transmissão única por *P. vivax*.

A indução de resposta imune do tipo variante-específica para a DBPII consiste em um desafio no desenvolvimento de vacinas protetoras baseadas neste antígeno de *P. vivax* (Sousa *et al.*, 2014). Desse modo, no intuito de se obter uma resposta contra a DBPII mais abrangente e não dependente das diferentes variantes de *P. vivax*, foi construída uma DBPII sintética, chamada DEKnull, na qual o epitopo variável predominante da proteína foi deletado (Ntumngia e Adams, 2012). Esta construção foi feita pelo nosso grupo de colaboradores da Universidade do Sul da Flórida (Dr. J. H. Adams e Dr. F. Ntumngia) que demonstraram a capacidade da DEKnull de estimular resposta de anticorpos inibitórios anti-DBPII em modelo animal e que tais anticorpos são dirigidos contra diferentes variantes da DBPII (Ntumngia *et al.*, 2013). No entanto, ainda não se sabe se esta construção é capaz de induzir resposta imune específica em populações naturalmente expostas a *P. vivax*, o que se pretende investigar no Brasil.

De relevância, para otimizar o potencial da DBPII como vacina humana, faz-se necessário identificar os requisitos para se induzir uma memória imunológica persistente. Neste contexto, apesar da resposta de anticorpos representar um componente importante na imunidade contra a DBPII (King *et al.*, 2008), ainda não se sabe sobre a geração de células B de memória (MBCs) antígeno-específicas. Assim, torna-se relevante investigar as MBCs específicas para a DBPII, incluindo as construções mais promissoras, como a DEKnull. Nossa hipótese é que alguns indivíduos possam ser capazes de montar uma resposta de MBCs DBPII-específicas que seja eficiente e de longa duração. Para tal, estudar indivíduos com história de primo-exposição à malária causada por *P. vivax* poderia ser relevante para os estudos iniciais que visem estimar a longevidade desta resposta.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo em área de transmissão autóctone de malária demonstraram que indivíduos expostos pela primeira vez à infecção por *P. vivax* desenvolvem anticorpos inibitórios contra a DBPII (Ceravolo *et al.*, 2009). Estes achados de anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor em primo-infectados constituem uma oportunidade única para se estudar a persistência da resposta humoral (anticorpos e células B de memória) na ausência de reexposição à doença. Particularmente, porque já foi demonstrado que a resposta

de anticorpos específicos para antígenos do parasito frente exposição única a *P. vivax* pode ser de longa duração (Braga *et al.*, 1998).

Embora a invasão de *P. vivax* aos eritrócitos seja altamente dependente da interação DBPII-DARC, estudos recentes sugerem que *P. vivax* pode usar uma via alternativa para infectar os eritrócitos (Ryan *et al.*, 2006; Cavasini *et al.*, 2007). Neste contexto, uma proteína recém-descrita de *P. vivax*, denominada EBP2 (*erythrocyte binding protein 2*) (Hester *et al.*, 2013), tem sido estudada pelo nosso grupo como potencial candidato a invasão de *P. vivax* em eritrócitos (Leticia M. Torres, Tese de Doutorado em andamento). A relevância destes achados faz com que o estudo da imunidade naturalmente adquirida a esta nova proteína seja fundamental. Dessa forma, esta proposta visa ainda caracterizar a resposta imune a EBP2 em indivíduos com história de primo-infecção por *P. vivax*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta imune humoral induzida por antígenos da forma sanguínea de *Plasmodium vivax*, especialmente a DBP_{II}, em indivíduos com história de exposição única a *Plasmodium vivax*, ocorrida em surto de transmissão autóctone em 2003, na região metropolitana de Belo Horizonte.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o ensaio celular para detecção de células B secretando imunoglobulinas (ELISpot para células B) específicas para antígenos da forma sanguínea de *P. vivax*, incluindo diferentes construções da DBP_{II}, a recém-descrita proteína EBP2 e a MSP₁₉, antígeno abundante na superfície do parasito;
- Determinar a presença e frequência de células B de memória para os antígenos de interesse, bem como para a proteína sintética, em indivíduos previamente expostos a um surto de transmissão autóctone de malária;
- Avaliar a persistência da resposta de anticorpos, para os antígenos de interesse, na população de estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo, voluntários e coleta de sangue

Em 2003, foi descrito pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais e Coordenação de Gestão da Região metropolitana de Belo Horizonte um pequeno foco de transmissão autóctone de malária por *P. vivax* na localidade de Souza (Figura 1), município de Rio Manso, a 70 km de Belo Horizonte, Minas Gerais (Cerbino *et al.*, 2004). O inquérito epidemiológico identificou como fonte provável do surto um morador que retornou da Amazônia infectado por *P. vivax*. Apesar de não endêmica, a região era permissiva à malária, por se encontrar nas margens de um dos braços da represa Brumadinho, onde existe uma alta densidade do mosquito vetor *Anopheles darlingi* (Zumpano *et al.*, 2004). Na região do surto, 25 casos de malária por *P. vivax* foram diagnosticados por microscopia óptica, sendo todos os pacientes tratados de acordo com protocolos clínicos bem estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

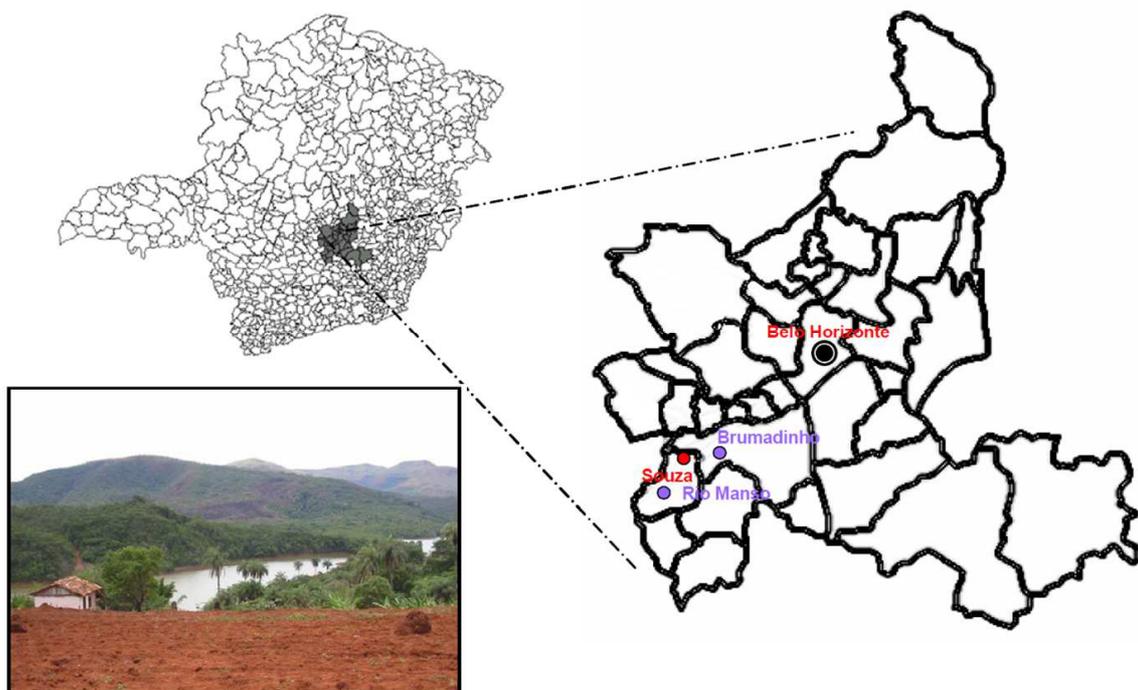


Figura 1: Mapa da região metropolitana de Belo Horizonte indicando a localização de Souza, município de Rio Manso, onde foi registrado o surto em 2003. Em destaque é possível observar a proximidade das residências com o criadouro do vetor da malária (adaptada de Ceravolo, 2007).

O surto foi considerado de curta-duração, com um período médio de 50 a 60 dias de transmissão. Na ocasião, o grupo de pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária do CPqRR/Fiocruz, MG, conduziu um estudo, do tipo longitudinal, para caracterizar a resposta imune humoral contra a PvDBP (Ceravolo, 2007). O estudo foi do tipo caso-controle incluindo 15 casos e 18 não-casos (residentes que não se infectaram). O acompanhamento dos indivíduos por cerca de 12 meses permitiu identificar cinco casos de recaída, que foram resultantes da ativação de formas latentes de *P. vivax*, os hipnozoítos (Ceravolo *et al.*, 2009).

No presente estudo, um novo corte-transversal foi realizado (novembro de 2015), aproximadamente 12 anos após o surto de transmissão autóctone. Como critérios de inclusão neste estudo, os indivíduos que foram expostos à transmissão de malária causada por *P. vivax* por ocasião do surto (casos e não-casos) deveriam preencher os seguintes requisitos (1) participação voluntária, através do consentimento livre esclarecido (TCLE); (2) residir na área de estudo e não ter visitado áreas endêmicas de malária; (3) apresentar idade maior ou igual a 15 anos; (4) não apresentar incapacidade física e/ou mental, (5) não ser portador de doença aguda/crônica debilitante. Assim, foram incluídos no estudo 13 dos 15 (86,7%) indivíduos previamente infectados com malária na região (caso). O estudo incluiu ainda 12 voluntários que, embora não tenham sido diagnosticados com malária na ocasião do surto, foram expostos ao risco de transmissão (não-caso). Todos os indivíduos participantes do estudo foram entrevistados por meio de um questionário (anexo 8.1) e aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o TCLE (anexo 8.2), conforme as normas vigentes para pesquisa ética envolvendo seres humanos (Resolução Nº 466, de 12 de Dezembro de 2012). Como controle não exposto, foram incluídos nove voluntários residentes em Belo Horizonte, MG, cujas amostras de soro e/ou plasma fazem parte do biorepositório do Grupo de Biologia Molecular e Imunologia da Malária do CPqRR (sob a guarda de L.H. Carvalho e F.S. Kano).

De cada indivíduo foram coletados cerca de 40 mL de sangue em heparina sódica (4 tubos do tipo vacutainer, BD Vacutainer), sendo o sangue mantido em isopor até a chegada ao laboratório, onde as amostras foram processadas imediatamente, para a obtenção de plasma e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), conforme descrito no item 4.3.

Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz Minas (CAAE: 50522115.7.0000.5091).

4.2 Proteínas recombinantes

4.2.1 Proteína ligante de *Duffy* de *P. vivax* (DBPII)

Para avaliação da resposta a DBP, foi utilizada proteína recombinante referente à região ligante da mesma (DBPII, aminoácidos 243 a 573, 39 kDa). As sequências utilizadas para produção da proteína recombinante foram referentes aos isolados Sal1 e Acre1, descrito pelo nosso grupo de pesquisa (Sousa *et al.*, 2010). Esta proteína recombinante vem sendo produzida na rotina do laboratório, conforme protocolo bem padronizado pelo nosso grupo (Souza-Silva *et al.*, 2010). A proteína mutada DEKnull foi cedida pelo nosso colaborador, o Dr. John H. Adams (University of South Florida, Tampa, EUA) e foi produzida de acordo com protocolo previamente descrito (Ntumngia e Adams, 2012).

4.2.2 Proteína de superfície do merozoíto 1 de *P. vivax* (MSP1)

A proteína de superfície do merozoíto 1 utilizada no estudo representa a região C-terminal de 19kDa (MSP1₁₉), aminoácidos 1616 a 1704, cedida gentilmente pela Dra. Irene Soares (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, Brasil). Os detalhes da construção dessa proteína foram descritos anteriormente (Soares *et al.*, 1999 e Cunha *et al.*, 2001).

4.2.3 Proteína ligante do eritrócito de *P. vivax* (EBP2)

A proteína EBP 2, de aproximadamente 40 kDa, referente à região entre os aminoácidos 161 e 480, foi produzida pela doutoranda Letícia de Menezes Torres, como parte do seu doutorado sanduíche em colaboração com o Dr. John Adams (University of South Florida, Tampa, EUA). O protocolo de produção e purificação da proteína foi realizado de acordo com metodologia previamente estabelecida pelo grupo do Dr. John Adams (Ntumngia e Adams, 2012).

4.3 Processamento das amostras de sangue: obtenção de plasma e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Dos 40 mL de sangue heparinizado coletados de cada indivíduo, 20 mL foram diluídos em 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) incompleto (24 mM bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicilina e 0,017 mM estreptomicina, pH 7,4), em tubo cônico de polipropileno de 50 mL (tubo tipo Falcon). Em seguida, a suspensão sanguínea foi lentamente colocada sobre uma solução de histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), na proporção de 2:1 (tubo de 50 mL), de modo a não romper a tensão superficial entre as duas camadas de densidades diferentes, e centrifugada (350 x g por 40 min a temperatura ambiente). Após a centrifugação, o anel de PBMCs, localizado na interface entre o plasma e o histopaque, foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo tipo Falcon de 50 mL já contendo meio de cultura RPMI 1640 incompleto. Para a obtenção do plasma, o volume restante do sangue total (20 mL) foi processado nas mesmas condições acima, porém sem ser diluído com meio de cultura, sendo o sobrenadante coletado e o plasma estocado até uso (-20°C). Após a lavagem (350 x g por 10 min a 4°C, 3x), as células foram ressuspensas em soro bovino fetal (Gibco), contadas em câmara de Neubauer e diluídas para uma concentração de 1×10^7 células/mL em soro bovino fetal suplementado com 10% de dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma-Aldrich). A suspensão de PBMCs (1×10^7 células/mL por crio-tubo, cryopure, Sarstedt) foi congelada lentamente, inicialmente a -80°C por 24h, com ajuda de recipiente para congelamento contendo isopropanol (Nalgene) e, posteriormente, a -196°C, sendo mantidas em nitrogênio líquido até uso.

4.4 Cultura das PBMCs e ativação policlonal das células B de memória circulantes

As PBMCs criopreservadas foram removidas do nitrogênio e incubadas rapidamente em banho-maria a 37°C para descongelamento. Em seguida, as células foram adicionadas em tubo do tipo Falcon de 15 mL contendo 10 mL de RPMI 1640 completo (24 mM bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicilina e 0,017 mM estreptomicina, 10% SBF, pH 7,4) pré-aquecido (37°C) contendo 20 µg/mL da enzima Benzonase® nuclease (Sigma-Aldrich), para evitar

aglutinação das células. As amostras foram centrifugadas (350 x g por 8 min a 4°C, 2x) para remoção do DMSO. Após descarte do sobrenadante e ressuspensão das células em RPMI 1640 completo, as células foram mantidas em gelo para que se realizasse a contagem das mesmas em câmara de Neubauer. Após contagem, as células foram diluídas em meio completo (RPMI 1640 10% SBF) e divididas em dois grupos: células a serem estimuladas e células não estimuladas. Para os experimentos, diferentes concentrações de células por poço da placa de cultura (placas de 24 poços de fundo chato, Costar®) foram testadas: 2×10^5 , 8×10^5 , 15×10^5 células/poço. Para diferenciação das células B de memória circulantes em células secretoras de anticorpos (ASCs), foi feito estímulo de acordo com dois protocolos diferentes: (1) cultivo por 3 dias com estímulo policlonal, utilizando o composto R848 (do grupo das imidazoquinolinas, agonista de receptor do tipo Toll 7/8 humano) (Mabtech) e interleucina 2 (IL-2) humana recombinante (Mabtech), de acordo com Jahnmatz e colaboradores (2013); (2) cultivo por 5 dias com os seguintes mitógenos: Oligodesoxinucleotídeo CpG ODN-2006 (Hycult biotech), Proteína A de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan SAC (Sigma-Aldrich), Lectina de *Phytolacca americana* (Sigma-Aldrich) e acréscimo de interleucina 10 (IL-10) humana recombinante (BD Pharmingen), no quarto dia de cultura (Weiss *et al.*, 2012). De modo geral, distribuiu-se 500 µL da suspensão celular por poço, seguidos de 500 µL do meio de cultura completo acrescido dos estímulos específicos.

4.5 Ensaio imunoenzimático (ELISpot) para detecção de células B secretoras de anticorpos específicos para DBPII, DEKnull, MSP1₁₉ e EBP2

A padronização do ensaio de ELISpot para detecção de células B secretoras de anticorpos IgG foi baseada em protocolos previamente descritos (Jahnmatz *et al.*, 2013 e Weiss *et al.*, 2012). Visando a otimização dos ensaios fez-se necessário, nos experimentos iniciais, avaliar diferentes condições, incluindo: (1) tipos de membrana, como fluoreto de polivinilideno, PVDF (MAIP, Merck millipore) e nitrocelulose (MAHA, Merck millipore) e (2) concentrações celulares (variando de $0,5 \times 10^5$ a 2×10^5 células/poço). Resumidamente, o protocolo geral envolveu sensibilizar as placas de 96 poços para ELISpot (Merck millipore) com anticorpo anti-IgG de captura MT91/145 (Mabtech) a 10 µg/mL, para detecção das células secretoras de anticorpos (controle positivo) e 100 µL de cada antígeno (DBPII, DEKnull, MSP1₁₉ e

EBP2) a 20 µg/mL para detecção das células B secretoras de anticorpos antígeno-específicas (**Figura 2**). As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 1x (137 mM NaCl 2,68 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e bloqueadas por 30 minutos com RPMI completo (temperatura ambiente). As células previamente cultivadas foram lavadas em RPMI 1640 completo (350 x g por 10 min a 4°C), para remoção dos anticorpos secretados e, então, adicionadas à placa de ELISpot, após o bloqueio (100 µL/poço, duplicata). As placas foram incubadas *overnight* a 37°C, 5% CO₂. Após a incubação, as células foram descartadas e as placas lavadas com PBS 1x (5 vezes). O anticorpo de detecção anti-IgG humana biotilado MT78/145 (Mabtech) foi diluído a 1 µg/mL em PBS 1x suplementado com 0,5% SBF e adicionado à placa para incubação por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas 1 hora a temperatura ambiente com estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (ALP) (Mabtech) diluída 1:1000 em PBS 1x suplementado com 0,5% SBF. O substrato para a enzima (BCIP/NBT, Mabtech) foi filtrado em filtro de 0,45 µm, adicionado aos poços e incubado ao abrigo da luz em temperatura ambiente. O substrato foi mantido até que fossem observados os *spots* (cerca de 15 minutos). A reação foi interrompida com água corrente e as placas secas no escuro. A leitura dos *spots* foi feita manualmente com auxílio de um microscópio estereoscópio (aumento de 10x). O valor obtido na contagem dos *spots* por poço foi corrigido para 1x10⁶ PBMCs e expresso como células secretoras de IgG (ASCs)/1x10⁶ PBMCs. Adicionalmente, também foi calculada a porcentagem de células secretoras de IgG específica entre o total de células de secretoras de IgG.

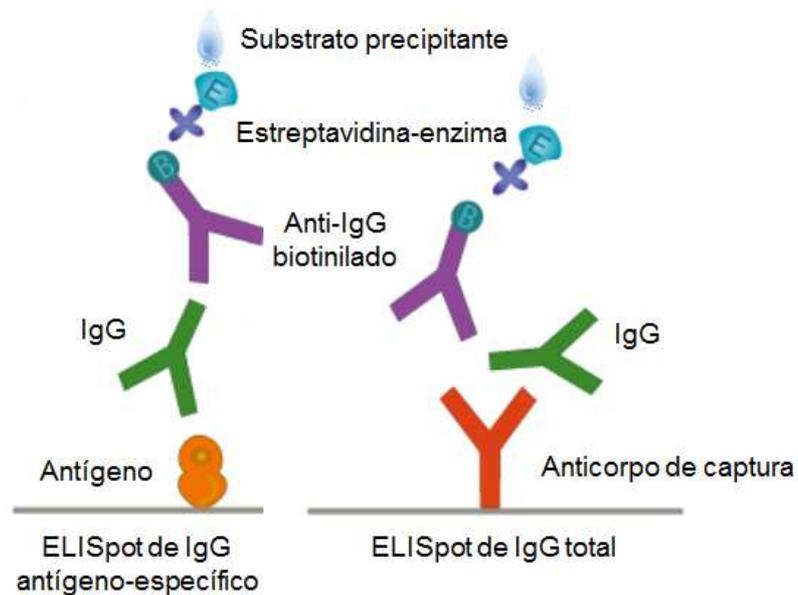


Figura 2: Ilustração esquemática do princípio do ensaio de ELISpot de IgG antígeno-específico e IgG total (adaptada de Mabtech), disponível em: <https://www.mabtech.com/sites/default/files/datasheets/3850-2A.pdf> . Acesso em maio de 2016.

4.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-DBPII, anti-MSP1₁₉ e anti-EBP2

A detecção de anticorpos IgG específicos contra proteínas de *P. vivax* foi realizada por ensaios de ELISA, de acordo com protocolos bem estabelecidos pelo grupo de pesquisa (Ceravolo *et al.*, 2005). Resumidamente, placas de 96 poços (NUNC MaxiSorp®) foram sensibilizadas por 12 horas a 4°C com 100 µL por poço das seguintes soluções: 3 µg/mL de DBPII, 1,0 µg/mL de MSP1₁₉ ou 1,5 µg/mL de EBP2 diluídas em PBS 1x. Após a incubação, a solução com os antígenos foi descartada e a placa foi lavada cinco vezes com uma solução de PBST (PBS 1x, 0,05% de Tween 20). A placa foi então bloqueada com 200 µL por poço da solução de PBST com 5% de leite em pó desnatado. Após 1 hora de bloqueio a 37°C, as placas foram lavadas cinco vezes com a solução de PBST e incubadas com 100 µL dos soros diluídos a 1:100 em tampão PBST contendo 3% de leite em pó desnatado. Todas as amostras foram feitas em duplicata. Terminada a incubação, as placas foram lavadas 10 vezes conforme descrito e deixadas mais 1 hora a 37°C com 100

μL por poço do conjugado anti-IgG humana ligado a peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000 em PBST com 3% de leite em pó desnatado. Para revelação, foi diluído um tablete de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich) em 50 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e 40 μL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck Millipore). A placa foi lavada mais 10 vezes e incubada a 37°C com 100 μL por poço da solução de revelação por aproximadamente 20 minutos. A reação foi interrompida com 50 μL de ácido sulfúrico 4N. A densidade ótica (DO) foi medida a 492 nm em leitor automático de ELISA (Spectra Max 340PC 384, Molecular Devices). Foi estabelecido o limite de positividade (*cutt-off*) entre os resultados positivos e negativos por meio da média observada para o ensaio com soros de 30 indivíduos nunca expostos à malária, acrescida de três desvios padrão. O valor obtido para DO 492 nm da amostra foi dividido pelo *cut-off* para obtenção do índice de reatividade (IR). Foram considerados positivos indivíduos com $\text{IR} > 1$.

4.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa *Prism 6.0 (GraphPad software)*. Inicialmente, foi realizado o teste de Grubb para detecção de possíveis *outliers* e o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos dados. As diferenças entre as medianas de dois grupos foram verificadas por meio do teste de Mann-Whitney. A avaliação da diferença de medianas entre mais de dois grupos foi feita pelo teste de Análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis, seguido de teste *post hoc* de Tukey ou Dunn, respectivamente, de acordo com a distribuição dos dados. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização dos protocolos de ativação policlonal das células B de memória circulantes

Dois diferentes protocolos de estimulação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram utilizados no intuito de promover a proliferação e diferenciação das células B de memória em células secretoras de anticorpos (ASCs) *in vitro*. O primeiro protocolo (*Protocolo 1*) se baseou no trabalho descrito por Jahnmatz e colaboradores (2013), onde as culturas de PBMCs foram estimuladas por três dias com IL-2 e o composto R848, um agonista de receptor tipo Toll (TLRs) 7/8. O segundo protocolo (*Protocolo 2*) foi descrito por Weiss e colaboradores (2012) e se baseia na estimulação por cinco dias consecutivos das culturas de PBMCs com IL-10 e uma mistura de mitógenos microbianos (CpG ODN-2006, SAC, PWM). A **Tabela 1** destaca as principais diferenças entre ambos os protocolos testados.

Tabela 1: Principais condições testadas para cada um dos dois protocolos de ativação das células B de memória (MBCs) circulantes em células secretoras de anticorpos (ASCs)

| Comparação entre os dois protocolos de ativação policlonal de células B | | | |
|---|-------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Protocolos * | Mitógenos | Células/poço | Tempo de estímulo |
| Protocolo 1 | IL-2 + R848 | 2x10 ⁵ | 72 h |
| Protocolo 2 | CpG ODN-2006 + PWM + SAC + IL-10 | 2x10 ⁵ | 120 h |

*Estímulo do protocolo 1 (Jahnmatz et al, 2013): Interleucina 2 (IL-2), Resiquimod (R848). Estímulo do protocolo 2 (Weiss et al, 2012): Oligodesoxinucleotídeo (CpG ODN-2006), mitógeno de *Phytolacca americana* (PWM), proteína A de *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC) e Interleucina 10 (IL-10).

Considerando apenas o número de células recuperadas após a estimulação policlonal das PBMCs, observou-se que para o protocolo 1 houve um aumento relativo do número de células obtidas após estímulo (**Figura 3A**). Já para o protocolo 2, o número de células recuperadas após estímulo foi semelhante àquele das culturas pré-estímulo. Adicionalmente, nas nossas condições, apenas o protocolo 1 foi capaz de promover a diferenciação das células B de memória presentes nas PBMCs em células secretoras de anticorpos IgG (ASCs), quantificadas no ensaio de

ELISpot (**Figura 3B**). De fato, o protocolo 1 se mostrou específico e reprodutivo, sendo os *spots* claramente visualizados nas placas após revelação. Assim, o protocolo 1 foi o escolhido para os experimentos subsequentes.

No intuito de aumentar o rendimento, isto é, o número de células a serem obtidas após estímulo, diferentes concentrações de PBMCs foram testadas por poço das placas de 24 poços (2×10^5 , 8×10^5 e 15×10^5). Após os três dias de cultura observou-se uma correlação positiva entre o número de células iniciais e aquele recuperado após o estímulo (**Figura 4**), sendo a diferença entre as concentrações de 2×10^5 e 15×10^5 estatisticamente significativa (comparação de medianas, Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn para identificação das diferenças, $P=0,0010$).

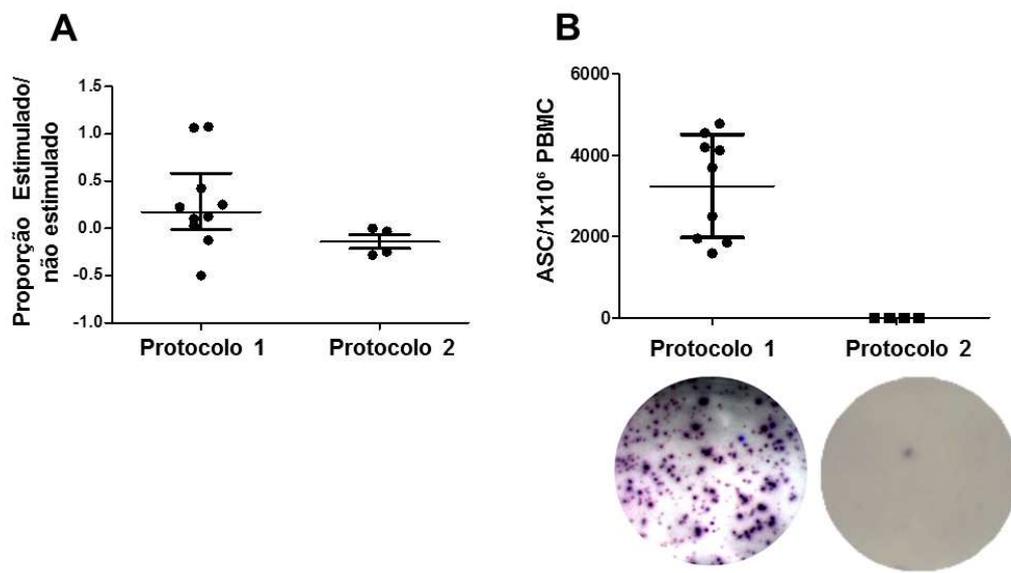


Figura 3: Comparação de dois protocolos de ativação policlonal de células B de memória (MBCs) circulantes. Para comparação dos protocolos foram utilizadas PBMCs de indivíduos normais. (A) Aumento relativo do número de células após estímulo com protocolo 1 ($n=10$) e protocolo 2 ($n=4$). O aumento foi calculado pela equação (valor final-valor inicial)/valor inicial. (B) Número de células secretoras de anticorpos IgG (ASCs) obtidas após ELISpot para os dois protocolos de estímulo testados. Resultado expresso em ASCs por 1×10^6 PBMCs. As imagens abaixo do gráfico são representativas do resultado observado no ELISpot com cada um dos protocolos. Cada ponto nos gráficos representa um poço, sendo as linhas transversais a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). Comparação de medianas feita por Mann-Whitney, significância avaliada para $p < 0,05$.

Apesar disto, quando analisado o número de células que se diferenciaram em ASCs, para cada uma dessas concentrações, não houve diferença estatística entre os grupos (Kruskal-Wallis, $P=0,2778$). Os resultados permitiram concluir que, embora a

concentração inicial de 15×10^5 células por poço tenha resultado em melhor rendimento, o uso de concentrações iniciais menores, caso se faça necessário, não resulta em prejuízo significativo no número final de ASCs no ensaio de ELISpot.

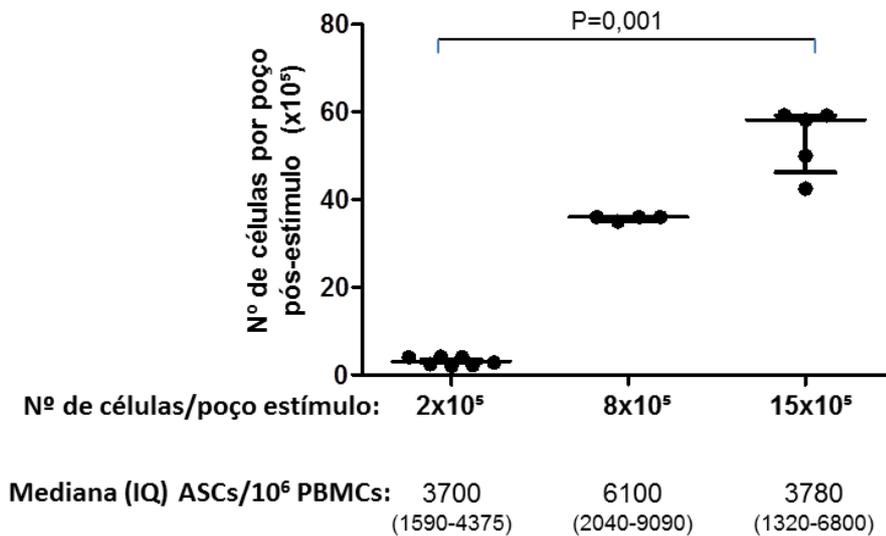


Figura 4: Padronização das condições ideais para o ensaio imunoenzimático (ELISpot) para células B de memória. Resultado expresso como a mediana do número de células por poço após o estímulo policlonal para as diferentes concentrações de PBMCs na cultura: 2×10^5 (n= 9), 8×10^5 (n=4) e 15×10^5 (n= 7) células/poço. Abaixo do gráfico está indicada a mediana e intervalo interquartil (IQ) das células secretoras de anticorpos (ASCs) detectadas no ELISpot para os diferentes grupos. Comparação de medianas feita por Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn para identificação das diferenças. Não foi encontrada significância estatística para as medianas do ELISpot (P=0,2778). Significância estatística avaliada para $p < 0,05$.

5.2 Padronização das condições ideais para o ensaio imunoenzimático (ELISpot) para células B de memória

Inicialmente, para padronização do ensaio de ELISpot para detecção de células secretoras de anticorpos IgG, diferentes concentrações de células pré-estimuladas (item 5.1) foram avaliadas, especificamente, $0,5 \times 10^5$, 1×10^5 e 2×10^5 células por poço. Embora tenham sido observadas ASCs em todas as concentrações utilizadas, a resolução dos spots foi melhor nos poços com $0,5 \times 10^5$ células (**Figura 5A**). Assim, esta concentração foi escolhida como de uso para a detecção de ASCs nos poços controles positivos, isto é, aqueles sensibilizados com anticorpo monoclonal anti-IgG (anticorpo de captura) para detecção de ASCs totais (sem especificidade de antígeno).

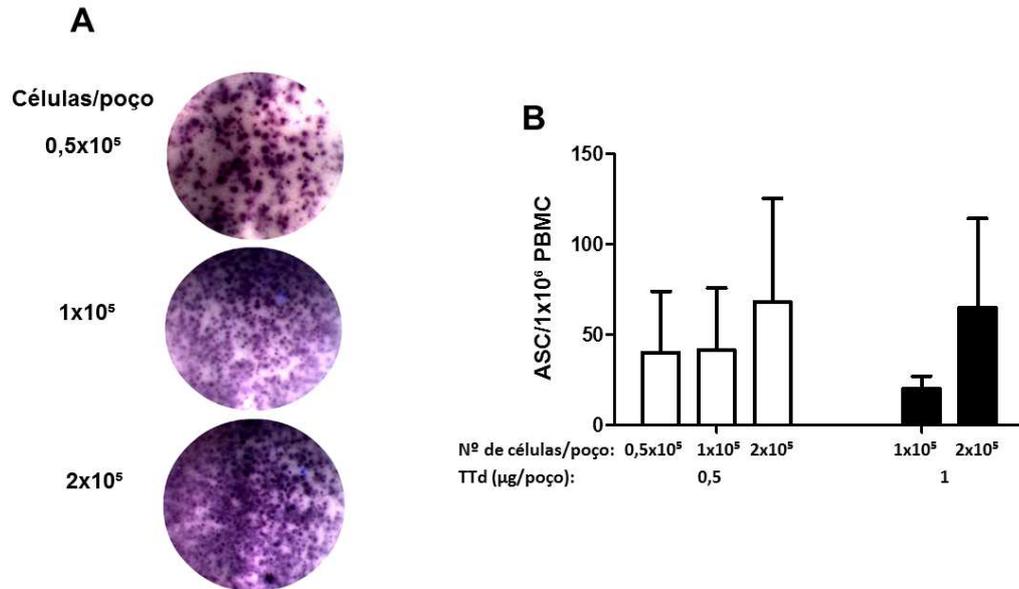


Figura 5: Padronização do ensaio de ELISpot para células secretoras de IgG inespecífica e antígeno-específica obtidas após estímulo. (A) Placa de ELISpot sensibilizada com anticorpo anti-IgG de captura. Imagens representativas dos poços de ELISpot com diferentes concentrações de células por poço: 0,5x10⁵, 1x10⁵ e 2x10⁵. (B) Placa de ELISpot sensibilizada com diferentes quantidade de toxoide tetânico (TTd): 0,5 µg ou 1 µg/poço. Cada poço contém diferentes concentrações de PBMCs de indivíduos imunizados com vacina antitetânica após estímulo policlonal: 0,5x10⁵, 1x10⁵ e 2x10⁵ PBMCs/poço. Resultados expressos em ASCs por 1x10⁶ PBMCs contados para diferentes concentrações do antígeno e de células/ poço do ELISpot. Cada coluna representa entre 2-7 poços por condição analisada. Significância estatística avaliada por Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney. Não foi encontrada diferença estatística para as condições mostradas, p<0,05.

A padronização do ELISpot para detecção de ASCs antígeno-específicas foi realizada com toxoide tetânico (TTd), um antígeno controle não relacionado à malária. Para isto, foram utilizadas nos ensaios PBMCs de indivíduos com história de vacinação antitetânica. Foram testadas duas concentrações diferentes de TTd para sensibilizar as placas (0,5 µg e 1 µg/poço) e diferentes quantidades de células (0,5x10⁵, 1x10⁵ e 2x10⁵ / poço). Como mostrado na **Figura 5B**, não foi encontrada significância estatística entre as medianas de ASCs para as diferentes concentrações de TTd (Mann Whitney, p=0,8) ou de células utilizadas nos ensaios (Kruskal-Wallis, p=0,7532). Assim, para os ensaios de ELISpot subsequentes utilizou-se como referência a concentração de 2x10⁵ células/poço. Esta concentração mais alta foi escolhida, pois se espera que a resposta antígeno-específica induzida pela imunidade natural a *P. vivax* seja menor que aquela resultante de vacinação antitetânica. Devido à limitação de reagentes e de amostras obtidas da população de estudo, optou-se por utilizar nos ensaios de ELISpot as proteínas de *P. vivax* em concentrações previamente determinadas na literatura

(Xainli *et al.*, 2002; Dadoo *et al.*, 2011), o que correspondeu a 2 µg/poço. A **Tabela 2** resume as condições aqui padronizadas para as culturas de PBMCs, com os respectivos estímulos, e para o ELISpot para detecção de células secretoras de anticorpos IgG policlonais ou antígeno-específicos.

Tabela 2: Resumo das condições padronizadas para detecção de células secretoras de anticorpos a partir da diferenciação das células B de memória circulantes

| Protocolo de ELISpot de células B estabelecido | | |
|--|--|---|
| Cultura das PBMCs e estímulo policlonal das células B | Células no estímulo | 15x10 ⁵ cel/mL |
| | Mitógenos | IL-2: 10 ng/mL R848: 1 µg/mL |
| | Período de incubação | 72 h |
| Elispot | Concentração do anticorpo de captura e antígenos | Anti-IgG: 1µg/poço TTd: 0,5 µg/poço PvDBPII, DEKnull, PvEBP2 e PvMSP1 ₁₉ : 2 µg/poço |
| | Número de células por poço | Anti-IgG: 0,5x10 ⁵ cel/poço Antígenos: 2x10 ⁵ cel/poço |
| | Sistema de revelação | Anticorpo biotilado + estreptavidina-ALP + BCIP/NBT |

5.3 Detecção de células B de memória antígeno-específicas após infecção (caso) ou exposição (não-caso) única a *P. vivax*, ocorrida em 2003

Visando avaliar a resposta de células B de memória específica para os antígenos de *P. vivax* na população de estudo, ensaios de ELISpot foram realizados para a detecção de anticorpos IgG secretados contra três diferentes construções da DBPII (Acre1, Sal1 e DEKnull). A **Figura 6A** ilustra os resultados de ASCs específicas para a DBPII Acre1 -- variante comum nas áreas de transmissão da Amazônia -- nos diferentes grupos analisados (caso, não-caso e controle não exposto). Os resultados mostraram que um número significativo de indivíduos dos grupos expostos à doença (caso e não-caso) desenvolveram resposta de ASCs específicas para DBPII Acre1, sendo a mediana de resposta entre aqueles que tiveram a doença (caso) maior quando comparada aos indivíduos que não adoeceram (não-caso) (ANOVA seguido de teste de Tukey, $P=0,0231$).

Conforme esperado, a quase totalidade dos controles não-expostos à malária não produziram ASCs antígeno-específicas, sendo a mediana de resposta deste grupo significativamente diferente dos indivíduos que foram diagnosticados para a doença (ANOVA seguido de teste de Tukey, $P=0,0008$). Adicionalmente, observou-se que há uma tendência significativa para queda da resposta de DBPII Acre1 nos grupos analisados (caso > não-caso > controle; regressão linear, $P=0,0003$).

A resposta de ASCs específica para a variante DBPII Sal1 (cepa referência) está ilustrada na **Figura 6B**, onde é possível observar que as medianas de resposta dos grupos caso (12,5 ASCs/ 10^6 PBMCs) e não-caso (9,25 ASCs/ 10^6 PBMCs) não diferem estatisticamente entre si, no entanto, ambas diferem do grupo controle negativo, onde nenhuma resposta foi detectada (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn, $P=0,0395$ e $P=0,0291$, respectivamente). Por outro lado, a resposta à proteína mutada (DEKnull) foi baixa ou não detectada na maior parte dos indivíduos previamente expostos a *P. vivax* (**Figura 6C**), não havendo diferença estatística entre as medianas dos diferentes grupos (Kruskal-Wallis, $P=0,0957$). A **Figura 6** permite concluir ainda que os indivíduos expostos a *P. vivax* na região do surto respondem melhor a DBPII Acre1 (13,75 a 27,5 ASCs/ 10^6 PBMCs) do que a variante de referência Sal1 (9,25 a 12,5 ASCs/ 10^6 PBMCs).

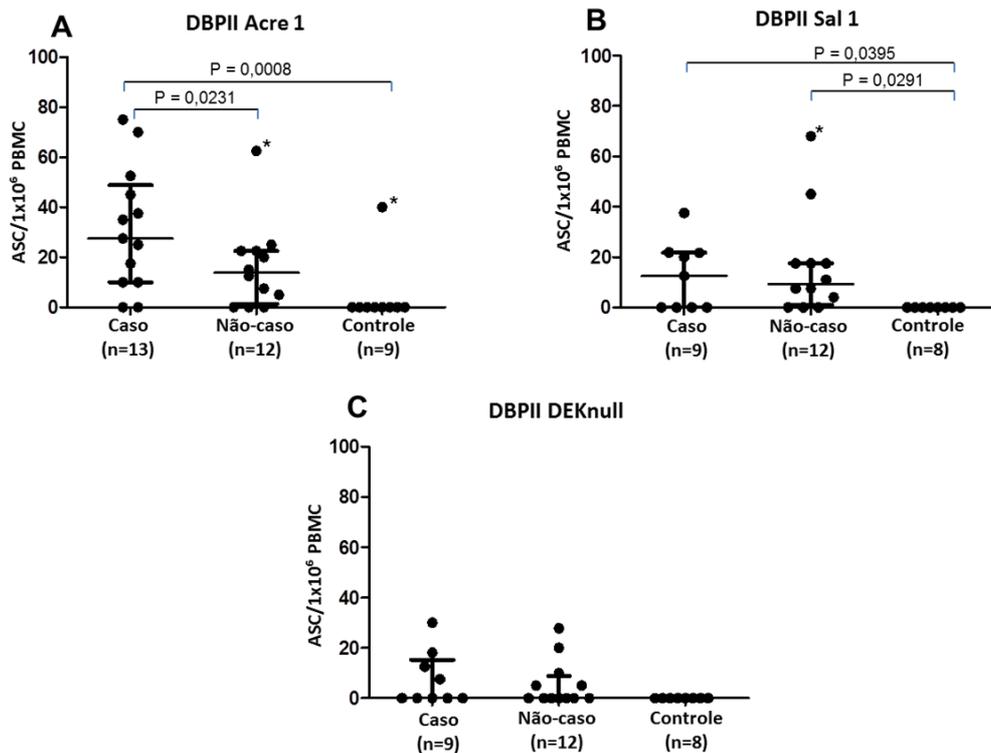


Figura 6: Resposta de células B de memória DBPII específicas após infecção (caso) ou exposição (não-caso) única a *P. vivax*, durante surto de transmissão autóctone ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Souza, Distrito de Rio Manso, 2003). Resultados expressos como células secretoras de anticorpos IgG (ASCs) por 1×10^6 células mononucleares no sangue periférico (PBMCs), sendo específicas para: (A) DBPII Acre 1, (B) DBPII Sal 1, (C) DBPII DEKnull. Cada ponto no gráfico representa um indivíduo, sendo as linhas transversais a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). O grupo controle representa voluntários de Belo Horizonte nunca expostos ao parasito. Comparação entre grupos feita por Anova ou Kruskal-Wallis, seguida de teste de Tukey ou Dunn para localização da diferença. Significância avaliada para $p < 0,05$. * Para fins estatísticos, os *outliers*, identificados pelo teste de Grubb, foram removidos da análise.

Tabela 3: Proporção de ASCs antígeno-específicas para diferentes construções da DBPII nos grupos caso, não-caso e controle não exposto

| Variante de DBPII | Mediana % (Q1-Q3) | | | P-valor |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------|
| | Caso | Não-caso | Controle | |
| Acre1 | 0,5 ^a (0,16 – 0,63) | 0,3 ^a (0 – 0,5) | 0 ^b (0 – 0) | 0,0024 |
| Sal1 | 0 ^{a'} (0 – 0,8) | 0,78 ^{a'} (0,01 – 1,5) | 0 ^{b'} (0 – 0) | 0,0082 |
| DEKnull | 0 (0 – 0) | 0 (0 – 0) | 0 (0 – 0) | NS |

Para cada indivíduo as proporções de ASCs antígeno-específicas foram calculadas em relação às ASCs IgG total. P-valor avaliado para $p < 0,05$ por comparação de medianas, Kruskal-Wallis. Diferenças aferidas por teste de Dunn indicadas pelas diferentes letras acima das medianas: a, b, a', b'.

No intuito de considerar as variações individuais de resposta e garantir que as diferenças observadas entre os grupos se devia à exposição ao parasito, os valores de ASCs antígeno-específicas foram expressos na forma de porcentagem em relação ao total de ASCs (detectadas por meio do anticorpo de captura anti-IgG). Como mostrado na **Tabela 3**, foi possível observar que há diferença de resposta de DBPII Acre1 e DBPII Sal1 entre os indivíduos expostos ao parasito (caso e não-caso) quando comparados aos indivíduos controle. Assim como o observado na **Figura 6C**, não houve diferença significativa de resposta para DEKnull entre os grupos analisados.

Adicionalmente, outros antígenos de *P. vivax* foram avaliados, incluindo a proteína majoritária da superfície dos eritrócitos infectados (MSP1₁₉) e uma proteína recém-descrita como alvo potencial para vacinas (EBP2). Desse modo, para a MSP1₁₉ foi observado que todos os dos indivíduos do grupo caso e parte significativa dos indivíduos não-caso apresentaram resposta a essa proteína (**Figura 7A**), sendo a mediana de resposta dos indivíduos do grupo caso (47,5 ASCs/10⁶ PBMCs) maior do que aquela dos indivíduos não-caso (16,25 ASCs/10⁶ PBMCs) (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn, P=0,0046) e maior do que aquela do grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn, P<0,0001). Estas diferenças foram confirmadas pela proporção de ASCs MSP1₁₉-específicas (**Tabela 4**), sendo as medianas do grupo caso (0,6) e não caso (0,4) diferente dos controles não expostos (0,0).

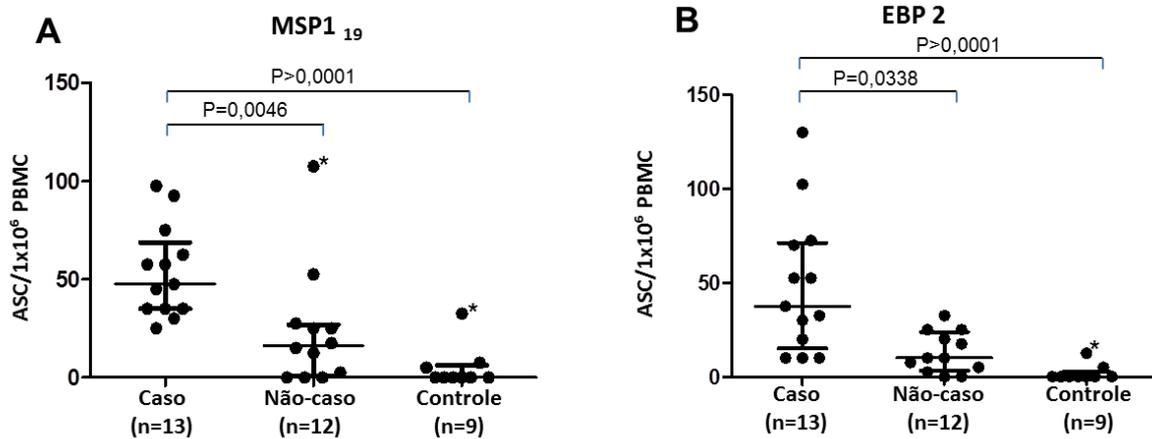


Figura 7: Resposta de células B de memória específicas para antígenos sanguíneos após infecção (caso) ou exposição (não-caso) única a *P. vivax*, durante surto de transmissão autóctone ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Souza, Distrito de Rio Manso, 2003). Resultados expressos como células secretoras de anticorpos IgG (ASCs) por 1×10^6 células mononucleares no sangue periférico (PBMCs), sendo específicas para: (A) MSP119, (B) EBP2. Cada ponto no gráfico representa um indivíduo, sendo as linhas transversais a mediana e o intervalo interquartil (Q1-Q3). O grupo controle representa voluntários de Belo Horizonte nunca expostos ao parasito. Comparação de medianas feita por Kruskal-Wallis, seguida de teste de Dunn para localização da diferença. Significância avaliada para $p < 0,05$. * Para fins estatísticos, os *outliers*, identificados pelo teste de Grubb, foram removidos da análise.

Com relação à resposta para a proteína recém-descrita, EBP2, os resultados demonstram que a proteína foi capaz de induzir uma resposta de ASCs significativa na maior parte dos indivíduos do grupo caso, com uma mediana de 37,5 ASCs por 1×10^6 PBMCs (**Figura 7B**); por outro lado, nos indivíduos do grupo não-caso, a resposta foi significativamente mais baixa (10 ASCs/ 1×10^6 PBMCs) (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn, $P=0,0338$). Tal padrão também foi observado quando se compara a proporção de ASCs EBP2-específicas, sendo a resposta observada nos grupos expostos à transmissão diferente daquela do grupo controle não-exposto (**Tabela 4**).

No intuito de definir o perfil de resposta individual para cada um dos antígenos estudados, os indivíduos foram categorizados em respondedores (alto, médio e baixo) e não respondedores. Para isto, o limite de resposta positiva foi arbitrariamente definido como >20 ASCs por 1×10^6 PBMCs. Essa categorização permitiu diferenciar os grupos estudados (**Figura 8**), sendo possível demonstrar que,

enquanto 100% dos indivíduos do grupo de casos responderam a pelo menos um dos antígenos avaliados, apenas 58% dos não-casos apresentaram ASCs antígeno-específicas. O pequeno número de casos não permitiu observar diferenças entre a presença (n=4) ou ausência (n=9) de recaídas. Dois dos indivíduos controles não expostos (2/9, 22%) apresentaram uma resposta no limite de detecção do ensaio, mas cada um destes indivíduos (C2 e C9) responderam a apenas uma das cinco proteínas de *P. vivax* testadas (MSP1₁₉ ou DBPII Acre1). De maneira geral, a proteína mais imunogênica foi a MSP1₁₉, seguida da EBP2, sendo que apenas contra estas duas proteínas foram identificados indivíduos classificados como alto respondedores.

Tabela 4: Proporção de ASCs antígeno-específicas para proteínas da fase sanguínea nos grupos caso, não-caso e controle não exposto

| Antígenos de fase sanguínea | Mediana % (Q1-Q3) | | | P-valor |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|---------|
| | Caso | Não-caso | Controle | |
| MSP1 ₁₉ | 0,6 ^a (0,5 – 0,9) | 0,4 ^a (0 – 0,6) | 0 ^b (0 – 0) | 0,0020 |
| EBP2 | 0,5 ^{a'} (0,3 – 1,1) | 0,16 ^{a'} (0 – 0,3) | 0 ^{b'} (0 – 0) | 0,0002 |

Para cada indivíduo as proporções de ASCs antígeno-específicas foram calculadas em relação às ASCs IgG total. P-valor avaliado para $p < 0,05$ por comparação de medianas, Kruskal-Wallis. Diferenças aferidas por teste de Dunn indicadas pelas diferentes letras acima das medianas: a, b, a', b'.

Com relação às proteínas relacionadas a DBPII, a mais imunogênica foi a DBPII Acre1, com frequência de resposta variando de 33% (não-caso) a 62% (caso). De fato, este resultado contrastou com aquele detectado para a DBPII Sal1, pois apenas 30% dos indivíduos que tiveram a doença responderam especificamente a essa variante. Apenas dois dos indivíduos estudados (S39 e S12) responderam a proteína mutada DEKnull.

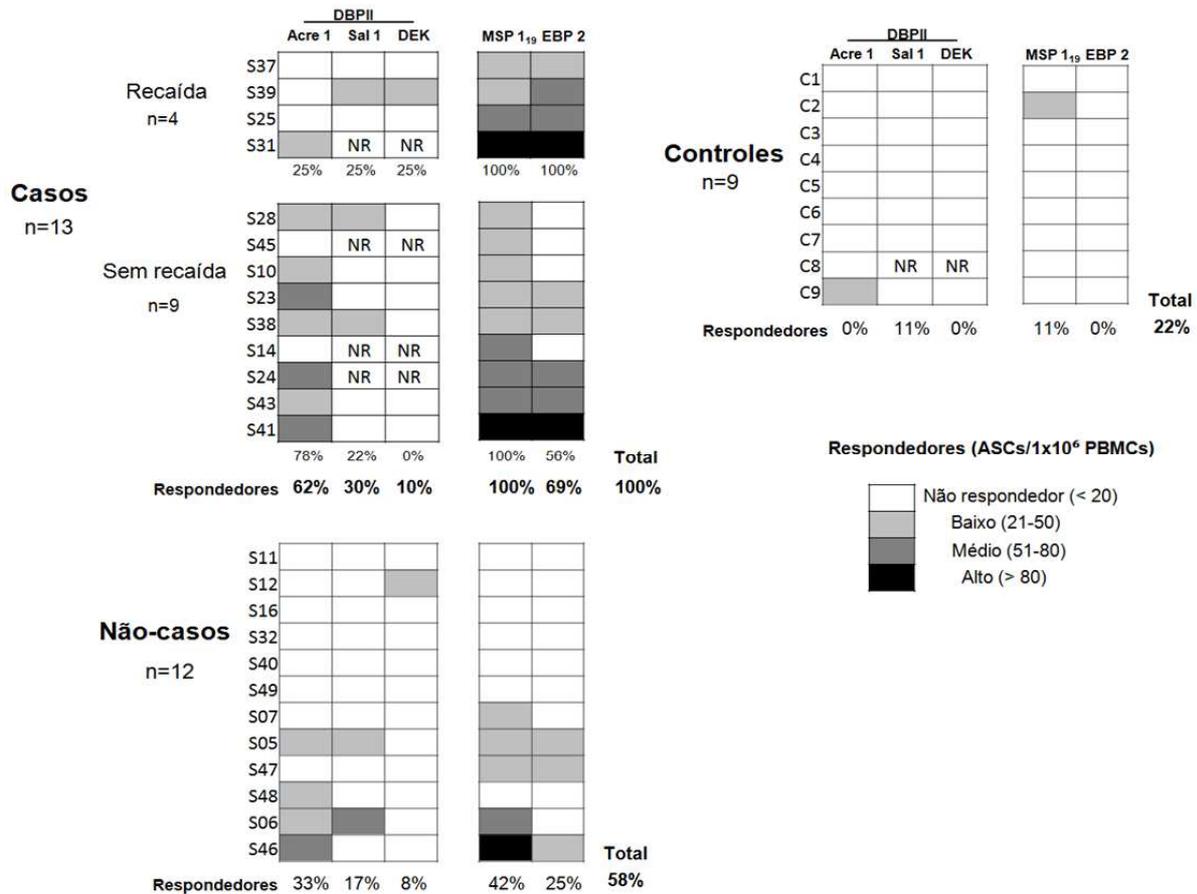


Figura 8: Resposta individual de células B antígeno-específicas nos indivíduos dos grupos caso, não-caso e controle. Cada linha representa um indivíduo, sendo os mesmos categorizados como respondedores (>20) alto, médio, baixo, ou não. Os indivíduos caso foram agrupados de acordo com a ocorrência (S37, S39, S25, S31) ou não (S28, S45, S10, S23, S38, S14, S24, S43, S41) de recaídas. O grupo controle (C1-C9) representa voluntários de Belo Horizonte nunca expostos ao parasito. Os valores abaixo da figura representam a frequência total de respondedores para cada uma das proteínas avaliadas.

5.4 Resposta de anticorpos IgG específicos para *P. vivax* após infecção única por *P. vivax*, ocorrida em 2003

Para avaliação da resposta de anticorpos dos indivíduos estudados, foi realizada sorologia convencional (ELISA) utilizando-se as diferentes proteínas recombinantes aqui estudadas. A disponibilidade de soros da época do surto (linha de base, 2003) permitiu a comparação com as amostras recém-coletadas (2015). As **Figuras 9A e B** representam a comparação da resposta de anticorpos para as duas variantes de DBPII estudadas (Acre1 e Sal1). Na época do surto, 8% e 25% dos indivíduos diagnosticados com malária (casos) apresentaram anticorpos IgG para as

proteínas Acre1 e Sal1, respectivamente. No entanto, nenhuma resposta foi detectada para estas proteínas em 2015. De fato, a negatividade de resposta de anticorpos também foi detectada para as demais proteínas estudadas (**Figuras 9C e D**), incluindo a MSP1₁₉ (**Figura 9C**), que foi altamente imunogênica na linha de base, com 92% dos indivíduos positivos no ELISA. Considerando os indivíduos expostos a *P. vivax*, mas que não se infectaram (não-caso), nenhuma resposta foi detectada na linha de base ou em 2015 (dados não mostrados).

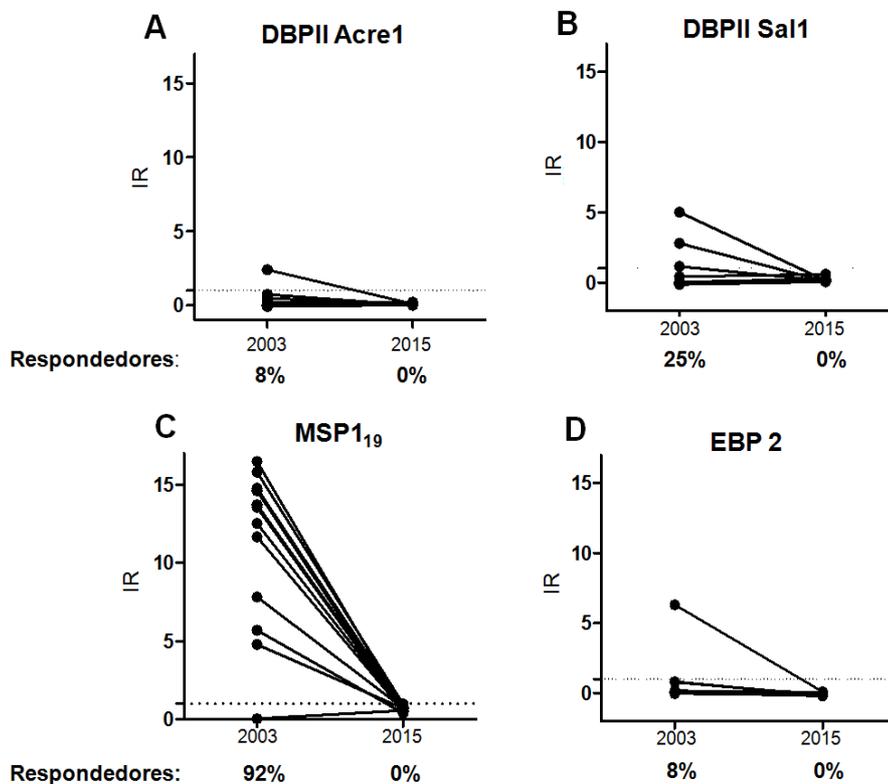


Figura 9: Reatividade do plasma para diferentes antígenos de forma sanguínea de *P. vivax* em indivíduos diagnosticados para malária (caso) em surto autóctone ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Souza, Distrito de Rio Manso, Minas Gerais). Resposta de anticorpos para 12 indivíduos caso na época do surto (2003) e 12 anos após a exposição ao parasito (2015). Índice de reatividade (IR) avaliado para as proteínas recombinantes (A) DBP II Acre1, (B) DBP II Sal1, (C) MSP1₁₉ e (D) EBP2. Foram consideradas positivas amostras com IR > 1, indicado pela linha pontilhada nos gráficos. Abaixo segue a porcentagem de indivíduos respondedores para cada proteína nos tempos avaliados.

6 DISCUSSÃO

Apesar de os anticorpos serem fundamentais na resposta imune dirigida contra estágios sanguíneos de *P. vivax* (Mueller *et al.*, 2013), pouco se conhece ainda sobre a resposta de células B, principalmente, as células B de memória (MBCs) e as plasmáticas de vida-longa, que são responsáveis pela resposta humoral de longa duração. Enquanto as células plasmáticas de vida-longa se localizam na medula óssea, sendo de difícil detecção em humanos, as MBCs estão presentes nos tecidos linfóides e sangue periférico (Kurosaki *et al.*, 2015). Assim, as MBCs circulantes têm se mostrado mais úteis nos estudos em humanos. De fato, achados recentes em modelos experimentais de malária demonstram que as frequências de MBCs no sangue periférico são um bom indicador do número de MBCs presentes no baço e medula óssea (Nduati *et al.*, 2010).

Do ponto de vista das vacinas antimaláricas atualmente em desenvolvimento, é importante avaliar se a estimulação antigênica é requerida para manter as células de memória; entretanto, este é um dos tópicos que tem sido controversos na malária (Longley *et al.*, 2016). Assim, fazem-se necessários estudos para avaliação da persistência da resposta humoral na ausência de estimulação antigênica, particularmente, frente aos antígenos candidatos a vacina contra *P. vivax*. A ocorrência de um surto de transmissão autóctone de *P. vivax*, na região metropolitana de Belo Horizonte, ocorrido em 2003, ofereceu uma oportunidade única para investigar a resposta humoral e de células B antígeno-específicas após 12 anos de exposição única ao parasito (Ceravolo *et al.*, 2009).

6.1 Estímulo policlonal *in vitro* para a diferenciação de células B de memória (MBCs) circulantes em células secretoras de IgG (ASCs) detectadas pelo ELISpot

O ensaio de ELISpot é um método muito bem estabelecido para detecção de células B de memória e vem sendo usado há vários anos na investigação de diversos patógenos e vacinas (Janetzki e Rabin, 2015). Devido ao seu amplo uso, existem diversos protocolos descritos na literatura para a ativação das MBCs circulantes, no entanto, a eficiência do ensaio é variável dependendo do tipo de estímulo utilizado (Jahnmatz *et al.*, 2013). Neste contexto, o presente trabalho

comparou dois protocolos para estímulo policlonal das células B de memória na malária. O protocolo descrito por Weiss e colaboradores (2012) se baseia no uso de uma combinação de mitógenos microbianos (PWM, CpG, SAC) associados a IL-10. Segundo estes autores, a eficiência do ensaio foi aumentada em função da IL-10, entretanto, nas condições aqui estudadas, este protocolo não permitiu indução eficiente de ASCs. De fato, experiências anteriores do nosso grupo de pesquisa com o protocolo original de Crompton e colaboradores (2009) já haviam demonstrado que esta mistura mitogênica não era suficiente para estimular a proliferação e diferenciação celular (dados não publicados).

Por outro lado, o protocolo que resultou em melhor estimulação foi baseado no uso de R848 e IL-2 como ativadores de MBCs, cuja descrição original foi realizada por Pinna e colaboradores (2009), posteriormente, aperfeiçoado por Jahnmatz e colaboradores (2013). A IL-2 é produzida pelas células T e tem papel crítico na diferenciação das células B em plasmócitos (Le Gallou *et al.*, 2012) e o R848 é um agonista dos receptores TLRs 7/8 humanos, que estimula as células B, aumentando assim a produção de imunoglobulinas (Tomai *et al.*, 2000); adicionalmente, a ativação policlonal com R848 induz a mitose dessas células (Bishop *et al.*, 2000). Assim, nas nossas condições, o uso da IL-2 em conjunto com o R848 se mostrou eficiente para que houvesse estimulação policlonal das MBCs e sua diferenciação em ASCs. O protocolo estabelecido por Jahnmatz e colaboradores (2013) se mostrou facilmente reprodutível e tem a vantagem de reduzir o tempo de estimulação *in vitro* de cinco para três dias; sendo assim, este foi o protocolo escolhido para realização dos experimentos futuros deste trabalho.

Além da etapa de pré-estimulação das MBCs circulantes, o ensaio de ELISpot otimizado por Jahnmatz e colaboradores (2013) tem como vantagens adicionais (1) o uso de anticorpo monoclonal e não policlonal para IgG humana e (2) aumento na sensibilidade pelo sistema de revelação (amplificação por biotina-estreptavidina). No presente estudo, incluiu-se ainda como controle positivo a detecção do número total de células secretoras de IgG, o que permitiu avaliar não só o número de ASCs antígeno-específicas mas também sua porcentagem em relação ao número total de ASCs.

6.2 Persistência de MBCs antígeno-específicas 12 anos após exposição única a *P. vivax*

Apesar de alguns estudos sugerirem que a reinfecção seria fundamental na manutenção da resposta de memória contra *P. vivax* (revisto em Langhorne *et al.*, 2008), existem estudos demonstrando que a resposta imune pode persistir mesmo na ausência de reinfecção com o parasito (Braga *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2004). No entanto, não há consenso acerca do desenvolvimento e persistência de células B de memória após episódios de malária. O presente estudo avaliou se a resposta de memória específica poderia ser detectada após um único episódio de exposição a *P. vivax*, ocorrido em 2003.

Nossos resultados demonstraram que uma única e curta exposição a *P. vivax* (cerca de 50 dias) foi capaz de induzir células B de memória circulantes de longa duração (pelo menos 12 anos) a diferentes antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax*. De relevância, foi possível detectar a diferenciação de células de memória em células secretoras de anticorpos IgG específicas em todos os indivíduos diagnosticados com a doença clínica na ocasião do surto (100% dos casos). É importante ressaltar ainda que uma proporção significativa dos indivíduos expostos ao surto, mas que não desenvolveram a doença clínica (não-caso), apresentaram populações de células B de memória antígeno-específicas; de fato neste grupo esta resposta variou de 8 a 42%, dependendo do antígeno estudado. Considerando que os indivíduos não-caso foram assim definidos por não terem desenvolvido sintomas clínicos da doença, isto não exclui a possibilidade de que algum tenha se infectado durante o surto. Especialmente, porque o diagnóstico laboratorial foi por microscopia ótica (pouco sensível) e por demanda passiva (sintomáticos). De fato, o perfil de resposta do grupo não-caso foi significativamente diferente dos indivíduos nunca expostos a doença (controle, 0-11%), levantando-se a suspeita de possíveis infecções assintomáticas na época do surto. Embora infecções maláricas assintomáticas não sejam frequentes em populações não imunes, como é o caso da região do surto de transmissão, não se pode descartar que fatores de resistência inata a malária, tais como as hemoglobinopatias (Lelliot *et al.*, 2015), possam ocorrer nesta população. Alterações genéticas do hospedeiro vertebrado que poderiam influenciar na malária, tais como anemia falciforme e talassemia, não foram investigadas na população estudada.

Até o momento, não existem dados sobre a longevidade da memória de células B em populações com história de exposição única a malária por *P. vivax*. Os dados disponíveis se relacionam a malária por *P. falciparum*, espécie que é biologicamente diferente do *P. vivax* (Mueller *et al.*, 2013). Apesar disto, os dados em *P. falciparum* demonstram a manutenção de células B de memória por 8 a 16 anos em alguns indivíduos (n=5) que retornaram para a Suécia após se infectarem com malária em países onde a doença é endêmica (Ndungu *et al.*, 2013). Apesar disto, uma parte significativa dos indivíduos que se infectaram não desenvolveram MBCs antígeno-específicas.

Em relação a *P. vivax*, os únicos dados disponíveis se relacionam a resposta de MBCs antígeno-específicas em indivíduos tailandeses com história de exposição infrequente à malária por *P. vivax* e *P. falciparum* (Wipasa *et al.*, 2010). Nestes indivíduos, expostos simultaneamente a baixos níveis de transmissão por *P. vivax* e *P. falciparum*, foi demonstrado que MBCs específicas para alguns antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax* (MSP1₁₉ e AMA1) poderiam ser detectadas por pelo menos 6 anos depois de episódios clínicos de malária. Entretanto, os dados de duração de resposta de memória de Wipasa e colaboradores (2010) apresentam muitas limitações, incluindo (1) os indivíduos terem sido continuamente expostos a transmissão, mesmo que em baixos níveis; (2) a exposição simultânea a *P. vivax* e *P. falciparum*, podendo haver resposta imune cruzada para estes dois parasitos (Carvalho *et al.*, 1997; Chuangchaiya *et al.*, 2010), (3) o histórico individual de malária ter sido investigado com base na malária clínica, o que não permite descartar infecções assintomáticas ou existência prévia de imunidade clínica nos indivíduos estudados.

De relevância, as frequências de MBCs antígeno-específicas encontradas nos estudos da Tailândia (Wipasa *et al.*, 2010) foram cerca de 10 vezes menores do que as detectada no presente estudo (0,02 a 0,04% versus 0,3 a 0,7%). Entretanto, como a metodologia de ELISpot utilizada naquele estudo (Crotty *et al.*, 2003) foi, aparentemente, menos sensível que o protocolo aqui utilizado (Jahnmatz *et al.*, 2013), estes dados são difíceis de serem comparados. Assim, as frequências de MBCs aqui encontradas podem ser comparadas apenas com outros estudos que utilizaram o mesmo protocolo de ELISpot. Neste contexto, as frequências aqui encontradas são comparáveis à resposta induzida por meio da vacinação contra diferentes agentes infecciosos, incluindo sarampo, rubéola, coqueluche e tétano

(Buisman *et al.*, 2009; Ingelman-Sundberg *et al.*, 2016). De fato, nos estudos de vacinação acima as frequências de ASCs antígeno-específicas variou de 0.2% a 0,5%. Em conjunto, os resultados aqui apresentados demonstram que uma única exposição a *P. vivax* foi capaz de induzir MBCs antígeno-específicas de vida-longa e em frequências relativamente altas, se comparadas àquelas induzidas por vacinas de eficácia comprovada.

Considerando a resposta de MBCs frente aos diferentes antígenos de *P. vivax* aqui avaliados, ênfase especial foi dada a diferentes construções da DBPII. O interesse na DBPII se justifica uma vez que existem evidências de que este ligante, essencial para a invasão de eritrócitos DARC positivos, induz anticorpos naturalmente adquiridos que protegem contra a doença clínica (King *et al.*, 2008), o que faz desta proteína um alvo vacinal promissor. Apesar disto, em nossos estudos, as construções de DBPII foram os antígenos menos imunogênicos quando comparados a outros antígenos de formas sanguíneas avaliados (MSP1₁₉ e EBP2). Este resultado era esperado, uma vez que, devido à sua localização em organelas apicais (micronemas), a DBPII só é exposta ao sistema imune no momento da invasão ao eritrócito, o que reduz as chances de induzir uma resposta imune eficiente (revisto por Sousa *et al.*, 2014). De fato, nosso grupo e outros demonstraram que a maior limitação das vacinas baseadas em DBPII é a baixa imunogenicidade da proteína (Ceravolo *et al.*, 2005; Kano *et al.*, 2012; Michon *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2005; Maestre *et al.* 2010). Estas limitações fizeram com que no presente estudo fossem avaliadas diferentes variantes da DBPII e um antígeno sintético destituído do epitopo polimórfico DEK (Ntumngia e Adams, 2012).

Entre as diversas construções avaliadas para a DBPII (Acre1, Sal1 e DEKnull), a resposta de MBCs para a variante Acre1 foi maior do que aquela para a variante Sal1. É interessante observar que a sequência de aminoácidos na região do ligante DBPII Acre1 se assemelha mais ao isolado de *P. vivax* que causou o surto do que a da cepa referência Sal1, conforme ilustrado na **Tabela 5**. Estes dados reforçam a natureza cepa-específica da resposta imune a DBPII, descrita inicialmente pelo nosso grupo (Ceravolo *et al.*, 2009), e confirmada posteriormente por outros (Cole-Tobian *et al.*, 2009; McHenry *et al.*, 2011). No entanto, existem razões para ser otimista, já que existem na DBPII regiões imunogênicas que são conservadas (Ntumngia e Adams, 2012), o que sugere que anticorpos voltados para essas regiões poderiam ser de ampla reatividade. Neste contexto, no presente

trabalho foi avaliada a DEKnull, proteína mutada, construída com base na sequência referência (Sal1) (Ntumngia e Adams, 2012). Os resultados aqui encontrados demonstraram a baixa imunogenicidade desta proteína, já que células secretando anticorpos IgG específicos para DEKnull praticamente não foram detectadas na população de estudo. Estes resultados confirmam achados prévios de Ntumngia e Adams (2012) demonstrando a menor imunogenicidade da DEKnull. Apesar disso, aqueles autores demonstram que anticorpos anti-DEKnull induzidos em modelo animal foram capazes de bloquear a invasão de *P. vivax* aos reticulócitos. Isto reforça os dados que o aprimoramento de construções como a DEKnull faz-se necessário para que uma resposta imune eficiente possa ser detectada. Neste sentido, outras construções estão sendo desenvolvidas (JH Adams, dados não publicados).

Tabela 5: Aminoácidos variantes na região II da *Duffy binding protein* (DBPII) nas diferentes variantes analisadas no estudo

| Isolado | Posição do codon | | | | | | | |
|---------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 371 | 384 | 385 | 386 | 417 | 424 | 437 | 503 |
| Sal 1 | K | D | E | K | N | L | W | I |
| Acre 1 | K | D | K | N | N | I | W | I |
| Surto | E | G | K | N | K | I | R | K |

Contrário ao observado para a DBPII, antígenos de superfície do parasito, como a MSP1₁₉, têm se mostrado mais imunogênicos (Ceravolo *et al.*, 2008; Ceravolo *et al.*, 2009). Os resultados aqui apresentados confirmam estes achados, pois 100% dos indivíduos do grupo de casos apresentaram MBCs específicas para esta proteína. Estes resultados podem ser explicados pelo baixo polimorfismo da MSP1₁₉, já que, embora existam diferentes formas alélicas dessa proteína, os anticorpos são dirigidos principalmente para seus epitopos conservados (Apio *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 1999).

De grande relevância foram os achados de que a maior parte dos indivíduos que tiveram a doença desenvolveram resposta de MBCs específica para a EBP2, proteína recém-descrita de *P. vivax*. Neste momento, não se sabe muito sobre esta proteína de forma sanguínea, no entanto, acredita-se que a mesma possa estar envolvida no processo de invasão de *P. vivax* aos eritrócitos (Hester *et al.*, 2013). Assim, os dados aqui encontrados sugerem que esta proteína tem potencial para ser

alvo para vacinas contra *P. vivax*, já que induz uma resposta de memória de células B de longa-duração. Estudos para elucidar o papel da EBP2 no processo de invasão do parasito estão em andamento pelo nosso grupo de pesquisa (Torres LM, Tese de Doutorado em andamento).

Em conjunto, nossos resultados demonstram que MBCs específicas para *P. vivax* podem ser detectadas por pelo menos 12 anos após a exposição e reforçam a possibilidade de uma vacina eficiente para as formas sanguíneas de *P. vivax*. No entanto, estudos futuros fazem-se necessários para aprimorar os antígenos candidatos à vacina.

6.3 Ausência de resposta de anticorpos anti-*P. vivax* após 12 anos de exposição única ao parasito

Existem muitas lacunas acerca da geração de memória de longa duração na malária, inclusive no que diz respeito à manutenção de anticorpos circulantes para *P. vivax*. Embora exista certo consenso de que os títulos de anticorpos contra os parasitos da malária diminuem na ausência de reexposição ao parasito, alguns estudos relatam que a resposta de anticorpos pode perdurar por um ou mais anos, dependendo de vários fatores, incluindo níveis de exposição ao parasito, variantes do parasito envolvidas na infecção e tratamento antimalárico (Ayieko *et al.*, 2013; Migot *et al.*, 1993).

No Brasil, a persistência de anticorpos anti-*P. vivax* na ausência de reexposição foi avaliada em indivíduos expostos a um surto de transmissão autóctone de malária causada por *P. vivax*, ocorrido em Mantena, MG (Braga *et al.*, 1998). Naquele estudo, os autores observaram que anticorpos para proteínas de superfície do esporozoítio (circum-esporozoita) e de formas sanguíneas de *P. vivax* (MSP1₁₉) persistiram por até 7 anos em cerca de 20-50% dos indivíduos estudados. De uma maneira geral, estes resultados contrastam com os nossos achados, tendo em vista que anticorpos contra *P. vivax* não foram detectados em nenhum dos indivíduos aqui estudados. Estes resultados poderiam ser explicados, em parte, pelas diferenças no tempo de avaliação da resposta de anticorpos, sendo de 12 anos no presente estudo contra 7 anos no estudo de Braga e colaboradores (1998). Outro fato que poderia influenciar nesta diferença de resposta é a variante de *P. vivax* que causou o surto, já que na área estudada uma única variante de *P. vivax* foi

detectada (Ceravolo *et al.*, 2009); de fato, na ocasião do surto de transmissão ficou demonstrado que os anticorpos anti-DBP além de cepa-específicos eram de vida-curta. De interesse, uma variante de DBP-II semelhante à que causou o surto aqui estudado (mesmos resíduos polimórficos na região do ligante) foi descrita na Tailândia (Wongkidakarn *et al.*, 2016). Os autores demonstraram que aquela variante não apresentava reatividade cruzada com outras presentes na área, o que reforça a ideia de especificidade de cepa.

Embora anticorpos circulantes contra *P. vivax* não tenham sido detectados na população de estudo, a persistência de células B de memória antígeno-específicas foi detectada em todos os indivíduos que tiveram a doença clínica. Discrepâncias entre a resposta humoral e celular também foram descritas por Wipasa e colaboradores (2010), onde menos de 10% dos indivíduos analisados apresentaram correlação entre os resultados e ELISA e ELISpot. Corroborando com estes achados, observações em crianças do Quênia demonstraram o declínio de anticorpos para níveis indetectáveis na ausência de exposição persistente a *P. falciparum*, mas manutenção das MBCs em níveis semelhantes àqueles encontrados nas crianças persistentemente expostas ao parasito (Ndungu *et al.*, 2012). Em resumo, no que concerne a resposta de memória de longa duração na malária, todos os dados corroboram para a importância de se avaliar MBCs específicas, pois estas populações refletem melhor a duração da resposta imune do que a avaliação dos anticorpos circulantes.

7 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos ao final deste trabalho permitiram concluir que:

1. O ensaio imunoenzimático *in vitro* para detecção de células B de memória diferenciadas em secretoras de anticorpos IgG (ELISpot), descrito por Jahnmatz e colaboradores (2013), se mostrou eficiente e reprodutível nas condições aqui avaliadas;
2. A infecção única por *P. vivax* induz células B de memória (MBCs) de longa duração (pelo menos 12 anos) contra diferentes antígenos de formas sanguíneas do parasito;
3. A possibilidade de que infecções assintomáticas por *P. vivax* ocorreram na época do surto de transmissão autóctone não pode ser descartada, uma vez que MBCs antígeno-específicas foram detectadas em indivíduos que foram expostos à transmissão;
4. Entre os antígenos avaliados neste trabalho, a MSP1₁₉ foi o mais imunogênico, seguida da EBP2;
5. A resposta de MBCs observada para DBPII foi variante-específica, sendo maior para a variante mais frequente no Brasil (Acre1) do que para a variante de referência (Sal1);
6. Contrário ao observado para as MBCs, os anticorpos circulantes contra antígenos de *P. vivax* não perduraram após 12 anos de infecção única por *P. vivax*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. 89: 7.085-7.089.

Apio B, Nalunkuma A, Okello D, Riley E, Egwang TG. Human IgG subclass antibodies to the 19 kilodalton carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1(19)) and predominance of the MAD20 allelic type of MSP1 in Uganda. *East Afr Med J*. 2000. Apr; 77(4):189-93.

Ayieko C, Maue AC, Jura WG, Noland GS, Ayodo G, Rochford R, John CC. Changes in B Cell Populations and Merozoite Surface Protein-1-Specific Memory B Cell Responses after Prolonged Absence of Detectable *P. falciparum* Infection. *PLoS One*. 2013. Jun 27;8(6):e67230.

Bargieri DY, Leite JA, Lopes SC, Sbrogio-Almeida ME, Braga CJ, Ferreira LC, Soares IS, Costa FT, Rodrigues MM. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*. 2010. Apr 1;28(16):2818-26.

Barnwell JW & Galinski MR. Invasion of vertebrate cells: Erythrocytes. In IW Sherman, *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. ASM PRESS. Washington, DC, 1998. Cap.7, p. 93-120.

Baird JK, Masbar S, Basri H, Tirtokusumo S, Subianto B, Hoffman SL. Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*. 1998. Aug; 178(2):592-5.

Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJI, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016. (January), 31.

Beeson JG, Osier FHA., & Engwerda CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends in Parasitology*, 2008, 24(12), 578–584.

Bishop GA, Hsing Y, Hostager BS, Jalukar SV, Ramirez LM, Tomai MA. Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. *J Immunol*. 2000. Nov 15;165(10):5552-7.

Bouillet LÉ, Dias MO, Dorigo NA, Moura AD, Russell B, Nosten F, Renia L, Braga EM, Gazzinelli RT, Rodrigues MM, Soares IS, Bruna-Romero O. 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. Sep;79(9):3642-52.

- Boyd MF. A review of studies on immunity to vivax malaria. *J Natl Malar Soc.* 1947. Mar;6(1):12-31.
- Boyle MJ, Wilson DW, Beeson JG. New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. *International Journal for Parasitology*, 2013, 43(1), 1–10.
- Braga EM, Fontes CJ, Krettli AU. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. *The Journal of Infectious Diseases*, 1998, 177(4), 1132–5.
- Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourão LC, de Ávila RA, Soares, IS, Fontes, CJ, Lacerda, MV, Chavez, Olórtegui C, Bartholomeu, DC, Fujiwara, RT, Braga, EM. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One*. 2011. 6(6):e21289.
- Buisman AM, de Rond CG, Oztürk K, Ten Hulscher HI, van Binnendijk RS. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine*. 2009 Dec 10;28(1):179-86.
- Carvalho LH, Fontes CJ, Fernandes AA, Marinuzzi HC, Krettli AU. Cross-reactive cellular immune response to circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in malaria-exposed individuals. *Parasite Immunol.* 1997. Feb;19(2):47-59.
- Cavasini CE, Mattos LC, Couto AA, Bonini-Domingos CR, Valencia SH, Neiras WC, Alves RT, Rossit AR, Castilho L, Machado RL. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007. Oct;101(10):1042-4.
- Ceravolo IP, Sanchez BAM, Sousa TN, Guerra BM, Soares IS, Braga EM, Carvalho LH. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 2009. 156(3), 502–510.
- Ceravolo IP, Souza-Silva FA, Fontes CJF, Braga EM, Madureira AP, Krettli AU, Carvalho LH. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2008, 67(3), 270–278.
- Ceravolo IP. Caracterização Imunológica e Molecular da Duffy Binding Protein do *Plasmodium vivax* em Áreas de Transmissão de Malária da Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte. 2007.

Ceravolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJ, Brito CF, Souza JM, Krettli AU, Adams JH, Carvalho LH. Anti-Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Antibodies Measure Exposure to Malaria in the Brazilian Amazon, 2005, 72(6), 675–681.

Cerbino VDA, Zumpano JF, Leopoldo FL et al. Follow-up of control measures during the *P. vivax* malaria outbreak in Rio Manso, Minas Gerais. Rev Bras Med Trop, 2004. 37:269.

Chootong P, McHenry AM, Ntumngia FB, Sattabongkot J, Adams JH. The association of Duffy binding protein region II polymorphisms and its antigenicity in Plasmodium vivax isolates from Thailand. Parasitol Int. 2014, Dec; 63(6):858-64.

Chootong P, Panichakul T, Permmongkol C, Barnes SJ, Udomsangpetch R, Adams JH. Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: approach to Plasmodium vivax vaccine development in Thailand. PLoS One. 2012. 7(4):e35769.

Chootong P, Ntumngia FB, VanBuskirk KM, Xainli J, Cole-Tobian JL, Campbell CO, Fraser TS, King CL, Adams JH. Mapping epitopes of the Plasmodium vivax Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. Infect Immun. 2010. Mar; 78(3):1089-95.

Chuangchaiya S, Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Pattanapanyasat K, Chotivanich K, Troye-Blomberg M, Cui L, Udomsangpetch R. Immune response to Plasmodium vivax has a potential to reduce malaria severity. Clin Exp Immunol. 2010. May;160(2):233-9.

Cohen S., Mc G.I., Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. Nature, 1961.192, 733–737.

Cole-Tobian JL, Michon P, Biasor M, Richards JS, Beeson JG, Mueller I, King CL. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous Plasmodium vivax strains in Papua New Guinean children. Infect Immun. 2009. Sep; 77(9):4009-17.

Collins, W.E., Jeffery, G.M., Roberts, J.M. A retrospective examination of reinfection of humans with Plasmodium vivax. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2004. 70 (6), 642–644.

Corcoran LM & Tarlinton DM. Regulation of germinal center responses, memory B cells and plasma cell formation-an update. Curr Opin Immunol. 2016. Apr;39:59-67.

Cowman AF & Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell, 2006. 124(4), 755–766.

Crompton PD, Moebius J, Waisberg M, Garver LS, Miller LH, Barillas C, Pierce SK. Mysteries of a Deadly Infectious Disease. Annu Rev Immunol., 2014. 157–187.

Crompton, P.D., Mircetic, M., Weiss, G., Baughman, A., Huang, C.Y., Topham, D.J., Treanor, J.J., Sanz, I., Lee, F.E., Durbin, A.P., Miura, K., Narum, D.L., Ellis, R.D.,

Malkin, E., Mullen, G.E., Miller, L.H., Martin, L.B., Pierce, S.K. The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naive individuals. *J. Immunol.* 2009. 182, 3318.

Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol.* 2003. Nov 15;171(10):4969-73.

Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine.* 2001 Nov 12;20(3-4):385-96.

Da Silva-Nunes M, Codeço CT, Malafronte RS, Da Silva NS, Juncansen C, Muniz PT, Ferreira MU. Malaria on the amazonian frontier: Transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008. 79(4), 624–635.

De Alvarenga DAM, Pina-Costa A, Sousa TN, Pissinatti A, Zalis MG, Brito CFA. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (*Cebinae* subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malaria Journal*, 2015. 14(1), 81.

Dodoo D, Hollingdale MR, Anum D, Koram KA, Gyan B, Akanmori BD, Ocran J, Adu-Amankwah S, Geneshan H, Abot E, Legano J, Banania G, Sayo R, Brambilla D, Kumar S, Doolan DL, Rogers WO, Epstein J, Richie TL, Sedegah M. Measuring naturally acquired immune responses to candidate malaria vaccine antigens in Ghanaian adults. *Malar J.* 2011. Jun 20;10:168.

Dos-Santos JCK, Angerami RN, Castiñeiras CMS, Lopes SCP, Albrecht L, Garcia MT, Costa FTM. Imported malaria in a non-endemic area: the experience of the university of Campinas hospital in the Brazilian Southeast. *Malaria Journal*, 2014. 13, 280.

Fontes CJ, Bathurst I, Kretzli AU. *Plasmodium vivax* sporozoite antibodies in individuals exposed during a single malaria outbreak in a non-endemic area. *Am J Trop Med Hyg.*, 1991. Jan;44(1):28-33.

Fowkes FJI, Boeuf P, Beeson JG. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology*, 2016. 7, 1–15.

Galinski MR, Meyer EVS, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*. Modern Strategies to Study a Persistent Parasite's Life Cycle. *Advances in Parasitology*. Elsevier. 2013. 81 (1), 1-26.

Grimberg BT, Udomsangpetch R, Xainli J, McHenry A, Panichakul T, Sattabongkot J, Cui L, Bockarie M, Chitnis C, Adams J, Zimmerman PA, King CL. *Plasmodium vivax*

invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med.* 2007 Dec;4(12):e337.

Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med.* 1999. Mar; 5(3):340-3.

Heppner DG. The malaria vaccine, status quo 2013. *Travel Med Infect Dis.* 2013. Jan-Feb;11(1):2-7.

Herrera S, Gomez A, Vera O, Vergara J, Valderrama-Aguirre A, Maestre A, Mendez F, Wang RB, Chitnis CE, Yazdani SS, Arevalo-Herrera M. Antibody response to *Plasmodium vivax* antigens in Fy-negative individuals from the Colombian Pacific Coast. *Am J Trop Med Hyg* 2005.73: 44-49.

Hester J, Chan ER, Menard D, Mercereau-Puijalon O, Barnwell J, Zimmerman PA, Serre D. De Novo Assembly of a Field Isolate Genome Reveals Novel *Plasmodium vivax* Erythrocyte Invasion Genes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013. 7(12).

Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science.* 1993. Aug 27;261(5125):1182-4.

Ingelman-Sundberg HM, Laestadius Å, Chrapkowska C, Mördrup K, Magnusson B, Sundberg E, Nilsson A. Diverse effects on vaccine-specific serum IgG titres and memory B cells upon methotrexate and anti-TNF- α therapy in children with rheumatic diseases: A cross-sectional study. *Vaccine.* 2016. Mar 4;34(10):1304-11.

Jahnmatz M, Kesa G, Netterlid E, Buisman AM, Thorstensson R, Ahlborg N. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods.* 2013. May 31;391(1-2):50-9.

Jangpatrapongsa K, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Cui L, Montgomery SM, Looareesuwan S, et al. Udomsangpetch, R. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microbes and Infection*, 2006. 8(3), 680–686.

Janetzki S, Rabin R. Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot) for Single-Cell Analysis. *Methods Mol Biol.* 2015. 1346:27-46.

Jemmely NY, Niang M, Preiser PR. *Plasmodium* evasion of immunity. *Future Microbiol.* 2010. 5(4), 663–682.

Jones DD, Wilmore JR, Allman D. Cellular Dynamics of Memory B Cell Populations: IgM⁺ and IgG⁺ Memory B Cells Persist Indefinitely as Quiescent Cells. *J Immunol.* 2015. Nov 15;195(10):4753-9.

Josling GA & Llinás M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nature Reviews. Microbiology*, 2015. 13(9), 573–87.

Kano FS, Sanchez BA, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, Nogueira PA, Gonçalves AQ, Fontes CJ, Soares IS, Brito CF, Rocha RS, Carvalho LH. Plasmodium vivax Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. 2012. Aug;17(8):989-1000.

King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, Chitnis CE. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. 105(24), 8363–8368.

Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malaria relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1985. 79: 1-11.

Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*. 2015. Mar;15(3):149-59.

Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, Joshi H. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal*, 2012, 11(1), 29.

Langhorne J, Ndungu FMM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*, 2008. 9(7), 725–732.

Lapouble OMM, Santelli ACFS, Muniz-Junqueira MI. Epidemiological situation of malaria in the Brazilian Amazon region, 2003 to 2012. *Pan American Journal of Public Health*, 2015. 38(4), 300–6.

Lazarou M, Guevara Patiño JA, Jennings RM, McIntosh RS, Shi J, Howell S, Cullen E, Jones T, Adame-Gallegos JR, Chappel JA, McBride JS, Blackman MJ, Holder AA, Pleass RJ. Inhibition of erythrocyte invasion and Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies. *Infect Immun*. 2009. Dec;77(12):5659-67.

Le Gallou S, Caron G, Delaloy C, Rossille D, Tarte K, Fest T. IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J Immunol*. 2012. Jul 1;189(1):161-73.

Lelliott PM, McMorran BJ, Foote SJ, Burgio G. The influence of host genetics on erythrocytes and malaria infection: is there therapeutic potential? *Malar J*. 2015. Jul 29;14:289.

Limongi JE, Chaves KM, De Paula MBC, Da Costa, FC, Silva, ADA, Lopes, Í DS, Ferreira, MS. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2008, 41(3), 232–237.

Lim KJ, Park JW, Yeom JS, Lee YH, Yoo SB, Oh JH, Sohn MJ, Bahk YY, Kim YS. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can

be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*. *Parasitol Res.* 2004. Mar;92(5):384-9.

Lin E, Kiniboro B, Gray L, Dobbie S, Robinson L, Laumaea A, Schopflin S, Stanisic D, Betuela I, Blood-Zikursh M, Siba P, Felger I, Schofield L, Zimmerman P, Mueller I. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. *PLoS ONE.* 2010. 5, e9047.

Longley RJ, Sattabongkot J, Mueller I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology*, 2016. 143(02), 154–170.

Lorenz C, Virginio F, Aguiar BS, Suesdek L, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malaria Journal*, 2015. 14(1), 408.

Lupi O, Vidigal AC, Longo C, Pina-Costa A, Saraiva RP, Ribeiro CTD, Brasil P. Estudo dos casos suspeitos de malária importada, um Centro de Referência na região extra-Amazônica. *Research*, 2014. 1:613.

Maestre A, Muskus C, Duque V, Agudelo O, Liu P, Takagi A, Ntumngia FB, Adams JH, Sim KL, Hoffman SL, Corradin G, Velez ID, Wang R. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for Duffy antigen receptor for chemokines (DARC). *PLoS ONE* 2010. 5: e11437.

Marsh K, & Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*, 2006, 28(1-2), 51–60.

McHenry AM, Barnes SJ, Ntumngia FB, King CL, Adams JH. Determination of the molecular basis for a limited dimorphism, N417K, in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *PLoS One.* 2011. 6(5):e20192.

Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001, 64: 97-106.

Michon P, Cole-Tobian JL, Dabod E, Schoepflin S, Igu J, Susapu M, Tarongka N, Zimmerman PA, Reeder JC, Beeson JG, Schofield L, King CL, Mueller I. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg.*, 2007. Jun; 76(6):997-1008.

Michon P, Fraser T, Adams JH. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun.* 2000. Jun; 68(6):3164-71.

Michon PA, Arevalo-Herrera M, Fraser T, Herrera S, Adams JH. Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. *Am J Trop Med Hyg.* 1998. Oct;59(4):597-9.

Migot F, Millet P, Chougnet C, Lepers JP, Deloron P. Humoral and cellular immune responses to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg.* 1993. Apr;48(4):524-9.

Miguel RB, Peiter PC, de Albuquerque H, Coura JR, Moza PG, Costa Ade P, Brasil P, Suárez-Mutis MC. Malaria in the state of Rio de Janeiro, Brazil, an Atlantic Forest area: an assessment using the health surveillance service. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 2014. 109(5), 634–640.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinnis MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: the Duffy blood group genotype FyFy. *New England Journal of Medicine*, 1976. 295: 302-304.

Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus PA, Syed SE, Uthaipibull C, Holder AA, Feeney J. Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *J Mol Biol.* 1999. May 28;289(1):113-22.

Mota MM & Rodrigues A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *BioEssays*, 2002. 24(2): 149-156.

Mueller I, Shakri AR, Chitnis CE. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*. 2015. Dec 22;33(52):7489-95.

Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*. *Epidemiological Observations and Potential Targets. Advances in Parasitology Elsevier*, 2013. 81: (3) 77-131.

Nduati, E.W., Ng, D.H., Ndungu, F.M., Gardner, P., Urban, B.C., Langhorne, J. Distinct kinetics of memory B-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *PLoS One*. 2010. 5, e15007.

Ndungu FM, Lundblom K, Rono J, Illingworth J, Eriksson S, Färnert A. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. *European Journal of Immunology*, 2013. 43(11), 2919–2929.

Ndungu FM, Olotu A, Mwacharo J, Nyonda M, Apfeld J, Mramba LK, Marsh K. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (21), 8247–52.

Ntumngia FB, Barnes SJ, McHenry AM, George MT, Schloegel J, Adams JH. Immunogenicity of a synthetic vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein region II. *Clin Vaccine Immunol.* 2014. Sep;21(9):1215-23.

Ntumngia FB, Schloegel J, McHenry AM, Barnes SJ, George MT, Kennedy S, Adams JH. Immunogenicity of single versus mixed allele vaccines of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein region II. *Vaccine*. 2013. Sep 13;31(40):4382-8.

Ntumngia FB, & Adams JH. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2012. 19(1), 30–36.

O'Donnell RA, Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, Crabb BS. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med*. 2001. Jun 18;193(12):1403-12.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, 2010. 9(1), 115.

Petter M, & Duffy MF. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. *Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations*, 2015. 57: 47-90.

Pina-Costa A, Brasil P, di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis, MC, Santelli, ACFS, et al., Daniel-Ribeiro, CT. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2014. 109(5), 618–633.

Qi Q, Guerra CA, Moyes CL, Elyazar IRF, Gething PW, Hay SI, Tatem AJ. The effects of urbanization on global *Plasmodium vivax* malaria transmission. *Malaria Journal*, 2012, 11(1), 403.

Richards JS, & Beeson JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunology and Cell Biology*, 2009. 87(5), 377–390.

Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Cômodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, Thomas AW, Soares IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol*. 2005. Feb;35(2):185-92.

Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW, Rosenberg R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2006. Oct;75(4):575-81.

Ryg-cornejo V, Ly ANN, Hansen DS. Immunological processes underlying the slow acquisition of humoral immunity to malaria, 2015. 199–207.

Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1991. Sep;45(3):297-308.

Salwati E, Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Silva HD. Differential Cellular Recognition of Antigens During Acute *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malaria. Europe PMC Funders Group, 2011. 203 (8): 1192–1199.

Sampaio VS, Siqueira AM, Alecrim MGC, Mourão MPG, Marchesini PB, Albuquerque BC, Lacerda MVG. Malaria in the state of Amazonas: A typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2015. 48(Suppl I), 4–11.

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Boletim Epidemiológico. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. 2015. Vol 46 (25).

Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (SES-MG). Malária em Minas Gerais, 2003-2007. In: Informe Epidemiológico/SES. Ano XI (4). 2008.

Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (SES-MG). Malária em Minas Gerais, Brasil, situação 2007 a 2012. 2013. Disponível em: http://saude.mg.gov.br/index.php?option=com_gmg&controller=document&id=13677-informe-sobre-malaria-em-minas-gerais-situacao-2007-a-2012. Acesso em 27/04/2016.

Senn N., Rarau P, Stanisic DI, Robinson L, Barnadas C, Manong D, Salib M, Iga J, Tarongka N, Ley S, Rosanas-Urgell A, Aponte JJ, Zimmerman PA, Beeson JG, Schofield L, Siba P, Rogerson SJ, Reeder JC, Mueller I. Efficacy of intermittent preventive treatment for malaria in Papua New Guinean infants exposed to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *PLoS Med*. 2012. 9 (6), e1001195.

Smith T, Felger I, Tanner M, Beck HP. Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999. Feb;93 Suppl 1:59-64.

Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues, MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg*. 1999. Mar;60(3):357-63.

Sousa TN, Kano FS, Brito CFA, Carvalho LH. The duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: Lessons from the Brazilian Amazon. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2014, 109(5), 608–617.

Sousa TN, Tarazona-Santos EM, Wilson DJ, Madureira AP, Falcao PR, Fontes CJ, Brito CF. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J*, 2010. 9(1), 334.

Sousa TN, Cerávolo IP, Fernandes Fontes CJ, Couto A, Carvalho LH, Brito CF. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among

Plasmodium vivax isolates from the Brazilian Amazon area. *Mol Biochem Parasitol*. 2006. Apr; 146(2):251-4.

Souza-Silva FA, Torres LM, Santos-Alves JR, Tang ML, Sanchez BA, Sousa TN, Fontes CJ, Nogueira PA, Rocha RS, Brito CF, Adams JH, Kano FS, Carvalho LH. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity. *PLoS One*. 2014. Apr 7;9(4):e93782.

Souza-Silva FA, Da Silva-Nunes M, Sanchez BAM, Ceravolo IP, Malafronte RS, Brito CFA, Carvalho LH. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in rural Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010. 82(2), 185–193.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Renneberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*. 2006. 313(5791): 1287-1290.

Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, et al. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N Engl J Med*. 2011. 365:1004–13.

Tomai MA, Imbertson LM, Stanczak TL, Tygrett LT, Waldschmidt TJ. The immune response modifiers imiquimod and R-848 are potent activators of B lymphocytes. *Cell Immunol*. 2000. Jul 10;203(1):55-65.

Tyler JS, Trecek M, Boothroyd JC. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. *Trends Parasitol*. 2011. Sep;27(9):410-20.

VanBuskirk KM, Sevova E, Adams JH. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. Nov 2;101(44):15754-9.

Vicentin EC, Franoso KS, Rocha MV, Iourtov D, Dos Santos FL, Kubrusly FS, Sakauchi MA, Raw I, Nosten F, R nia L, Rodrigues MM, Russell B, Soares IS. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect Immun*. 2014. Mar;82(3):1296-307.

Weiss GE, Ndungu FM, McKittrick N, Li S, Kimani D, Crompton PD, Marsh K, Pierce SK. High efficiency human memory B cell assay and its application to studying *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in natural infections. *J Immunol Methods*. 2012. Jan 31;375(1-2):68-74.

Wertheimer SP & Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol*. 1989 Nov; 69(4):340-50.

White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar. J.*, 2011. 10, 297.

Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, et al., Hafalla JCR. Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathogens*, 2010. 6(2): e1000770.

Wongkidakarn S, McHenry AM, Sattabongkot J, Adams JH, Chootong P. Strain-Transcending Inhibitory Antibodies against Homologous and Heterologous Strains of Duffy Binding Protein region II. *PLoS One*. 2016. May 4;11(5):e0154577.

World Health Organization (WHO), World Malaria Report 2015. Ed. Who Press, WHO, Geneva, 2015.

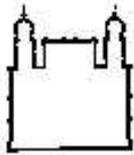
Xainli J, Adams JH, King CL. The erythrocyte binding motif of *plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Mol Biochem Parasitol*. 2000. Dec;111(2):253-60.

Xainli J, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Adams JH, King CL. Age-dependent cellular immune responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in humans. *Journal of Immunology*, 2002. 169(6), 3200–7.

Zumpano JFR, Chaves MOC, Silva RB et al. Study of *P. vivax* malaria relapses in Sousa District, Rio Manso municipality, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Med Trop* 2004; 37:267.

ANEXOS

Anexo 1 - Questionário aplicado aos indivíduos participantes do estudo



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Laboratório de Malária

Anexo- Questionário

Data ____/____/____

Paciente N^o _____ Caso (1) ou Controle (2): _____

Nome _____

Idade _____ Sexo (1) F (2) M Cor (1) branca (2) parda (3) negra

Município de Residência _____

Endereço _____

Telefone de contato _____

Você lembra do surto de malária? Sim(1) Não (2) (3) não sabe informar

Em caso positivo, teve contato ou viu falar na doença novamente? Sim (1) não (2)

Se sim, explicar: _____

No momento da coleta:

Sinais e ou sintomas de malária aguda (1) sim (2) não (3) duvidoso

Optimal realizado? (1) sim (2) não Resultado (1) positivo (2) negativo (3) duvidoso

Você teve malária na época do surto? (1) sim (2) não (3) duvidoso

Quantas vezes? _____

Alguém da sua casa teve malária (1) sim (2) não (3) não sabe

Caso você teve, lembra quando foi sua última malária? _____

Teve Sintomas na época (1) sim (2) não

Quais? _____

Na época, você concluiu o tratamento para malária (1) sim (2) não (3) não sabe (9) não se aplica

Você chegou a ser hospitalizado por malária? (1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica

Se sim, por quanto tempo? _____

Como acha que pegou malária? _____

Você reside nessa área? (1) Sim (2) Não

Há quantos anos você reside nessa área? _____

Você viajou recentemente? (1) Sim (2) Não Local _____ Data: _____

Ida ____/____/____ Volta ____/____/____

Nos últimos anos você residiu ou visitou áreas da Amazônia brasileira? (1) Sim (2) Não (3) não sabe

Onde? _____ Quanto tempo _____

Apresentou nos últimos cinco anos, alguma doença grave?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica

Se sim, qual? _____

Está gripado ou com alguma infecção?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica

Sinais/sintomas? _____

Está fazendo uso de algum medicamento? (1) Sim (2) Não (3) Não sabe

Se sim, qual? _____

Se sim, há quanto tempo _____

Você sabe como transmite a malária? _____

Você como evitar a malária? _____

Obs: _____

Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes do estudo



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa sobre a “Avaliação da imunidade natural de longa-duração à proteínas recombinantes do *Plasmodium vivax* que estão envolvidas na invasão e/ou desenvolvimento do parasito no eritrócito”, que será coordenado pela Dra. Luzia Helena Carvalho, pesquisadora do Centro de pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ) de Belo Horizonte, Minas Gerais

Você foi selecionado para participar deste projeto de pesquisa porque reside na comunidade de Sousa, Distrito de Rio Manso, onde aconteceu um surto de malária (doença transmitida pela picada de mosquitos) em 2003. Mais especificamente, você ou alguém da sua família teve a doença naquela ocasião. Entretanto, sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a equipe da pesquisa ou com a Instituição.

O objetivo deste estudo é saber se o seu sistema imune (que é a parte do seu corpo que é responsável por combater os micróbios) ainda lembra que você teve a doença (esta lembrança do seu organismo é chamada de memória). Isto é importante para saber se as vacinas que estão sendo desenvolvidas podem ser eficientes para induzir esta memória (sem isto as vacinas podem não ser protetoras contra a doença).

Caso você aceite participar, a sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário onde constam perguntas, tais como, sua idade, se teve ou não a doença na época, se visitou áreas da Amazônia (onde existe a doença). Além disto iremos coletar o seu sangue. Vamos coletar cerca de 3 tubos de sangue (10 ml cada, isto é, cada tubo corresponde a cerca de uma colher de sopa de sangue). Esta quantidade de sangue retirada não causa nenhum problema a sua saúde. A coleta de sangue vai ser realizada com tubos descartáveis e todo o material também é descartável, incluindo agulhas e as luvas usadas pela nossa equipe de pesquisa. A coleta de sangue pode gerar um certo desconforto no momento da picada da agulha e existe a possibilidade de formação de um “rouxidão” no local da punção. Entretanto, todas as providências serão tomadas para diminuir ao máximo estas possibilidades. Nossa equipe sabe coletar bem o sangue e tem muita experiência nisto. Além do material ser descartável nós vamos limpar bem a sua pele com álcool (fazer assepsia), no local da picada, para evitar a possibilidade de contaminação no momento da coleta. Caso a coleta de sangue deixe uma rouxidão no seu braço, este efeito é temporário e não vai ficar muito tempo no seu braço. Mas, caso esta coleta de sangue leve a algum dano permanente em você, nós vamos indenizá-lo de acordo com os termos legais vigentes no Brasil

Você ou sua comunidade não terão nenhum benefício direto e imediato relacionado a esta pesquisa. Mas, a sua contribuição neste estudo é importante porque este estudo poderá contribuir para o desenvolvimento futuro de uma vacina contra a malária. Você também poderá ter acesso aos resultados da nossa pesquisa. Para isto basta que entre em contato conosco e nós podemos lhe explicar os resultados pessoalmente, por escrito ou por telefone.

O material que sobrar do seu sangue, nós estamos pedindo a sua autorização para não jogar fora, mas guardar apropriadamente no nosso laboratório. Este material (resto do seu sangue) será mantido a baixas temperaturas para ser conservado e poderá ser usado em pesquisas futuras relacionadas a este projeto. Caso nós decidirmos fazer outro projeto de pesquisa, nós voltaremos e iremos pedir novamente a sua autorização para usar o sangue estocado. Quando isto acontecer você poderá aceitar ou não que utilizaremos o seu sangue guardado. Você será sempre o dono da sua amostra guardada no nosso laboratório e nós seremos apenas os guardiões e vamos cuidar para que esta amostra de sangue seja bem preservada ao longo dos anos. A qualquer momento também você poderá nos solicitar que não guarde mais o material proveniente do seu sangue. Neste caso, nos descartaremos apropriadamente a sua amostra. Você será sempre o dono da sua amostra guardada no nosso laboratório e instituição e nós seremos apenas os guardiões.

As suas informações obtidas mediante essa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua identidade. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, sendo o seu sangue e os dados obtidos identificadas com um código, conhecido somente pelo responsável por esta pesquisa.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta os telefones e o endereço institucional do coordenador desta pesquisa (Dra. Luzia Helena Carvalho) e do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da nossa instituição (Dr. Naftale Katz, Presidente), e você poderá a qualquer momento nos ligar para tirar suas dúvidas sobre sua participação, esta pesquisa ou a doença.

Luzia Helena Carvalho
 Coordenadora do Projeto
 Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz-MG
 Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, CEP: 30190-002 Belo Horizonte
 Fone (31) 3349-7793 / (31) 91974144
 Comitê de Ética, Presidente, Dr. Naftale Katz: (31) 3349-7825

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Sousa, _____ de _____ de 20__

Nome do voluntário da pesquisa

Assinatura do voluntário

