

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

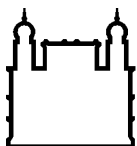
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes, Proteína 3 da Superfície do Merozoíto (MSP-3), Proteína Rica em Glutamato (GLURP) e Antígeno de Pré-fertilização 48/45 (Pfs48/45), em populações expostas à malária na Amazônia brasileira

BARBARA DE OLIVEIRA BAPTISTA

Rio de Janeiro

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BARBARA DE OLIVEIRA BAPTISTA

Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes, Proteína 3 da Superfície do Merozoíto (MSP-3), Proteína Rica em Glutamato (GLURP) e Antígeno de Pré-fertilização 48/45 (Pfs48/45), em populações expostas à malária na Amazônia brasileira

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Lilian Rose Pratt Riccio

RIO DE JANEIRO

2017

II

Baptista, Barbara de Oliveira .

Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes, Proteína 3 de Superfície do Merozoíto (MSP-3), Proteína Rica em Glutamato (GLURP) e Antígeno de Pré-fertilização 48/45 (Pfs48/45), em populações expostas à malária na Amazônia brasileira / Barbara de Oliveira Baptista. - Rio de Janeiro, 2017.

161 f.; il.

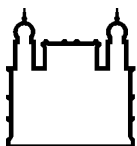
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Lilian Rose Pratt Riccio.

Bibliografia: f. 120-136

1. Malária. 2. Plasmodium falciparum. 3. GMZ2.6c. 4. Anticorpo. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BARBARA DE OLIVEIRA BAPTISTA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DA CANDIDATA A VACINA ANTIMALÁRICA GMZ2.6C E SEUS COMPONENTES, PROTEÍNA 3 DA SUPERFÍCIE DO MEROZOÍTO (MSP-3), PROTEÍNA RICA EM GLUTAMATO (GLURP) E ANTÍGENO DE PRÉ-FERTILIZAÇÃO 48/45 (PFS48/45), EM POPULAÇÕES EXPOSTAS À MALÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

ORIENTADORA: Dra. Lilian Rose Pratt Riccio

Aprovada em: 29 / 09 / 2017

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Dalma Maria Banic – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ - **Presidente**

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado – Universidade Federal Fluminense/UFF

Profa. Dra. Sylvia Lopes Maia Teixeira – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Profa. Dra. Graziela Maria Zanini – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/FIOCRUZ

Profa. Dra. Martha Cecília Suárez Mutis – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2017

A *Deus* que sempre me guiou para que eu não desistisse no primeiro tropeço e me auxiliou a seguir em frente com determinação e confiança no alcance dos meus objetivos.

A minha avó *Sônia Maria de Oliveira Baptista* e ao meu tio *Marco Aurélio de Oliveira Batista* pela educação e exemplo de vida. Se cheguei até aqui, devo muito a essas duas pessoas.

AGRADECIMENTOS

À *Fundação Oswaldo Cruz* e ao *Instituto Oswaldo Cruz* pela oportunidade e pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento de minha dissertação.

À Doutora *Lilian Rose Pratt Riccio*, pela orientação e exemplo pessoal e profissional. Obrigada pela amizade, carinho, conselhos, compreensão, não se tornando apenas minha orientadora, mas também uma grande amiga. Obrigada também pelo estímulo, oportunidades, dedicação, conhecimento, apoio e pela força que me concedeu em todos os momentos em que precisei, além da confiança depositada em mim durante todo o tempo em que trabalhamos juntas, desde minha graduação. Sem você, não somente neste trabalho, mas em todo caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

Ao Doutor *Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro* por me receber tão gentilmente em seu laboratório e por todo seu apoio durante esses anos.

À Doutora *Evelyn Kety Pratt Riccio*, pela amizade, apoio e colaboração, dando dicas valiosas para a realização desse trabalho.

Ao Doutor *Paulo Renato Rivas Totino* e ao mestrando *Cesare Bianco*, por todo o apoio antes, durante e após o trabalho de campo, indispensáveis para o seu sucesso.

À aluna de iniciação científica *Ana Beatriz Lopes de Souza* pela dedicação, convivência, companheirismo e por toda a sua ajuda e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho, se tornando uma grande amiga ao longo desses anos.

Aos membros da equipe de trabalho de campo, Doutores *Lilian Rose Pratt Riccio*, *Evelyn Kety Pratt Riccio*, *Josué da Costa Lima Junior*, graduanda *Ana Beatriz Lopes de Souza*, por toda amizade, companheirismo e ajuda durante os 40 dias de intenso trabalho.

Ao Doutor *Rodrigo Medeiros* e doutoranda *Jamile Dombrowski* pela amizade e por permitirem e facilitarem a realização dos trabalhos em seu laboratório na Universidade Federal do Acre (UFAC), em Cruzeiro do Sul.

Ao Doutor *Michael Theisen*, pela importante colaboração e pelas proteínas recombinantes.

Aos amigos do laboratório de imunoparasitologia, Doutor *Josué da Costa Lima Junior*, pelas valiosas discussões, doutorandos *Lana Bittencourt*, pelo auxílio no diagnóstico molecular e *Rodrigo Nunes*, pelo auxílio na predição de epítomos B.

A todos os *pacientes* de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará, não só pelo material biológico, mas pela confiança e interesse que demonstraram no auxílio à pesquisa.

A *Kátia* e *Ivanusia*, da Unidade de Saúde da Família Sofia de Almeida Barreto, ao *Mario*, *Urlaete*, *Fátima* e *Elber*, do Hospital Dr. Abel Pinheiro Maciel Filho, a *Gorete*, *Manoel*, *Roque*, *Ferreira*, *Neilson* e toda a equipe de agentes de saúde de Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul e Guajará por todo o apoio indispensável para a realização do trabalho de campo.

Ao *Hélio Cameli*, *Nielson* e *Francisco*, da Coordenação de Endemias de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará, pela permissão e apoio da realização do trabalho de campo nesses locais.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)* e *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, por terem financiado essa parte de minha formação.

Aos Doutores *Dalma Maria Banic*, *Ricardo Luiz Dantas Machado*, *Sylvia Lopes Maia Teixeira*, *Graziela Maria Zanini* e *Martha Cecília Suárez Mutis*, por aceitarem o convite para participar da banca desta dissertação.

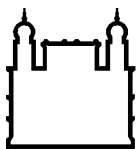
Aos *professores* do Curso de Pós-graduação, pelos conhecimentos adquiridos e pelas valiosas discussões.

Aos amigos do Laboratório de Malária, *Aline Lavigne*, *Aline Moreira*, *Ana Beatriz*, *Cesare*, *Claudinha*, *Cláudio*, *Edmar*, *Fátima*, *Flávia*, *Hugo*, *Jéssica*, *Kamilla*, *Larissa*, *Leonardo*, *Lilian*, *Luana*, *Lucas*, *Luciana*, *Natália* e *Paulo*, pela amizade, apoio, paciência e carinho, indispensáveis para a realização deste trabalho.

A todos que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram não apenas para o desenvolvimento desse trabalho, fornecendo dados ou sanando dúvidas, mas que diariamente estão presentes na minha vida de alguma maneira e que seus atos e palavras construtivas me ajudaram a conquistar minhas metas e objetivos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

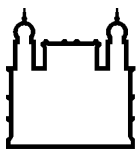
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DA CANDIDATA A VACINA ANTIMALÁRICA GMZ2.6C E SEUS COMPONENTES, PROTEÍNA 3 DA SUPERFÍCIE DO MEROZOÍTO (MSP-3), PROTEÍNA RICA EM GLUTAMATO (GLURP) E ANTÍGENO DE PRÉ-FERTILIZAÇÃO 48/45 (PFS48/45), EM POPULAÇÕES EXPOSTAS À MALÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Barbara de Oliveira Baptista

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Estima-se que ocorram 212 milhões de casos e 300 mil mortes decorrentes de malária anualmente, principalmente devido à infecção por *P. falciparum*. Assim, uma vacina eficaz é possivelmente a arma potencial para reduzir de forma drástica essas estatísticas. Entretanto, embora mais de 30 antígenos tenham sido identificados como candidatos a vacina, até o momento nenhum deles gerou uma perspectiva sólida de que uma vacina possa estar disponível nos próximos anos. Torna-se assim fundamental a pesquisa de novos candidatos vacinais. A GMZ2.6c é uma proteína recombinante que contém fragmentos de 3 antígenos candidatos a vacina contra *P. falciparum*, MSP-3, GLURP e Pfs48/45. Ensaios clínicos realizados na África mostraram que a GMZ2, contendo MSP-3 e GLURP, é bem tolerada, segura e imunogênica e que os anticorpos induzidos foram específicos e funcionais, capazes de controlar o crescimento *in vitro* do *P. falciparum*. Importa, entretanto, verificar se o mesmo potencial é apresentado pelas populações-alvo no Brasil, uma vez que os parasitos circulantes aqui são geneticamente distintos daqueles na África e também porque a constituição genética da população pode influenciar na resposta imune aos antígenos vacinais. No presente trabalho, nos propomos a avaliar a resposta imune humoral contra a GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira. O estudo foi concentrado nas cidades de Cruzeiro do Sul (Acre), Mâncio Lima (Acre) e Guajará (Amazonas). Foram coletadas 124 amostras em Cruzeiro do Sul (grupo CZS), 88 em Mâncio Lima (grupo ML) e 87 em Guajará (grupo GJ). Também, foram coletadas amostras de 53 indivíduos sem história de malária, que foram usadas como controles de área. Foi avaliada a resposta imune contra a proteína recombinante GMZ2.6c e os fragmentos individuais. Para mapeamento epitópico, foram utilizados 4 peptídeos correspondentes a diferentes regiões da MSP-3, 13 da GLURP e 2 de Pfs48/45. A pesquisa de anticorpos IgG, IgM, IgE e IgA contra as proteínas recombinantes e o mapeamento de epítomos B da GMZ2.6c foram realizadas pela técnica de ELISA. A pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi realizada em todas as amostras que apresentaram anticorpos IgG. Nossos dados mostraram que a maior parte dos indivíduos dos grupos CZS (84%), ML (74%) e GJ (72%) apresentavam anticorpos que reconheciam a GMZ2.6c e que esses anticorpos foram principalmente da classe IgG. Dentre os fragmentos da GMZ2.6c, a GLURP-R0 foi a mais amplamente reconhecida nos três grupos estudados e os anticorpos dirigidos a esta região foram, preferencialmente, da classe IgG. As subclasses de IgG que predominaram foram as citofílicas (IgG1 e IgG3), fato importante considerando que a aquisição de uma imunidade protetora está associada aos níveis de IgG1 e IgG3. O mapeamento epitópico da GMZ2.6c mostrou que os epítomos imunodominantes foram P11 e P3, derivados da GLURP-R0. Em conjunto, nossos dados mostraram que a proteína GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos nas populações estudadas e que entre os componentes individuais da GMZ2.6c, a GLURP se revelou mais imunogênica durante a infecção natural.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF THE ANTIBODY RESPONSE AGAINST MALARIA VACCINE CANDIDATE GMZ2.6C AND ITS COMPONENTS, MEROZOITE SURFACE PROTEIN 3 (MSP-3), GLUTAMATE RICH PROTEIN (GLURP) AND PRE-FERTILIZATION ANTIGEN (PFS48/45), IN NATURALLY EXPOSED INDIVIDUALS LIVING IN THE BRAZILIAN AMAZON

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Barbara de oliveira Baptista

Malaria is caused by blood-borne apicomplexan parasites of the genus *Plasmodium*. According to the latest estimates approximately 212 million cases and 300 000 deaths due to malaria occur worldwide, mainly due *P. falciparum* infection. Thus, an effective vaccine is possibly the potential weapon to drastically reduce these statistics. However, although more than 30 antigens have been identified as vaccine candidates, so far none have generated a solid prospect that a vaccine may be available in the next years. The search for new vaccine candidates is therefore fundamental. GMZ2.6c is a recombinant protein containing fragments of 3 *P. falciparum* vaccine candidate, MSP-3, GLURP and Pfs48/45. Clinical trials performed in Africa have shown that GMZ2, containing MSP-3 and GLURP, is well tolerated, safe and immunogenic and that antibodies induced were able to control the *in vitro* *P. falciparum* growth. However, it is important to verify if this potential is observed in individuals living in Brazil, since circulating parasites are genetically different from those in Africa and the genetic background of the population can influence the immune response to the vaccine antigens. In this work, we evaluated the humoral immune response against GMZ2.6c and its components (MSP-3, GLURP and Pfs48/45) in individuals living in malaria endemic areas in the Brazilian Amazon. This study was carried out in Cruzeiro do Sul (Acre), Mâncio Lima (Acre) and Guajará (Amazonas). A total of 124 samples were collected in Cruzeiro do Sul (CZS group), 88 in Mâncio Lima (ML group) and 87 in Guajará (GJ group). Samples from 53 individuals with no previous malaria episode were collected and used as area controls. IgG, IgM, IgE and IgA antibodies against GMZ2.6c and the individual fragments were evaluated by ELISA. For epitope mapping, 4 peptides corresponding to different regions of MSP-3, 13 of GLURP and 2 of Pfs48/45 were used. IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 antibodies against recombinant proteins were analyzed in all samples that presented IgG antibodies. Our data showed that most individuals in the CZS (84%), ML (74%) and GJ (72%) groups had antibodies that recognized GMZ2.6c and that these antibodies were mainly of the IgG class. Among the fragments of GMZ2.6c, GLURP-R0 was the more widely recognized in the three groups studied and the antibodies against this region were mainly of the IgG class. The predominant IgG subclasses were cytophilic (IgG1 and IgG3), an important fact considering that the acquisition of a protective immunity against malaria is associated with IgG1 and IgG3 levels. The epitope mapping of GMZ2.6c showed that the immunodominant epitopes were P11 and P3 from GLURP-R0. Our data showed that the GMZ2.6c protein is widely recognized by antibodies in the studied populations and that among the individual components of GMZ2.6c, GLURP was more immunogenic during natural infection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A malária	1
1.2. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.....	4
1.2.1. O ciclo no homem.....	5
1.2.2. O ciclo no mosquito.	6
1.3. A busca por uma vacina antimalárica.....	9
1.4. Papel dos anticorpos na infecção malárica	19
1.5. A proteína recombinante GMZ2.6c	22
1.5.1. Proteína Rica em Glutamato (GLURP).....	22
1.5.2. Proteína de Superfície de Merozoíto 3 (MSP-3)	24
1.5.3. Antígeno de Pré-fertilização 48/45 (PFS48/45)	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. METODOLOGIA	30
4.1. Descrição das áreas.....	30
4.2. Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários.....	37
4.3. Comitê de ética	38
4.4. Coleta de dados pessoais e epidemiológicos	38
4.5. Coleta de sangue	38
4.6. Diagnóstico	39
4.6.1. Diagnóstico microscópico	39
4.6.2. Diagnóstico molecular	40
4.7. Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos.....	40

4.8.	Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas recombinantes GMZ2.6c, GLURP-R0, MSP-3Ct e Pfs48/45-6c e mapeamento epitópico	43
4.9.	Análise dos dados epidemiológicos e estatísticos	45
4.9.1.	Teste de Spearman	45
4.9.2.	Teste do Qui-quadrado.....	45
4.9.3.	Teste de Mann Whitney	46
4.9.4.	Teste de Wilcoxon	46
5.	RESULTADOS	48
5.1.	Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos dos participantes do estudo.....	48
5.2.	Frequência da resposta anticorpo para a GMZ2.6c e seus componentes, MSP-3, GLURP e Pfs48/45.....	55
5.3.	Frequência da resposta anticorpo das classes IgG, IgM, IgA e IgE para a GMZ2.6c e seus componentes, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45.....	63
5.4.	Frequência de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c e seus componentes, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45.....	74
5.5.	Mapeamento de epítomos B da GMZ2.6c nos grupos CZS, ML e GJ ..	87
5.6.	Avaliação da resposta IgG contra a GMZ2.6c, seus componentes e os epítomos B nos grupos CZS, ML e GJ, antes (D0) e após o tratamento (D15)	93
6.	DISCUSSÃO	106
7.	CONCLUSÕES	118
8.	PERSPECTIVAS	119
9.	REFERÊNCIAS	120
ANEXOS		137
9.1.1.	Anexo I – Parecer Comitê de ética	138
9.1.2.	Anexo II – Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) - Malária	150

9.1.3.	Anexo III – Termo de assentimento livre e esclarecido (TALE)	153
9.1.4.	Anexo IV - Questionário.....	156
9.1.5.	Anexo V – Termo de consentimento livre e esclarecido - Controle	158

1. INTRODUÇÃO

1.1. A malária

A malária é uma doença parasitária de elevada prevalência e morbidade, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Existem mais de 250 espécies de *Plasmodium* que parasitam mamíferos, aves e répteis (1), entretanto, somente seis espécies parasitam naturalmente o homem: *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium knowlesi* (White, 2008) e *Plasmodium simium* (Brasil *et al.*, 2017). A malária é transmitida através da picada do inseto vetor, a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, sendo o *An. darlingi* a principal espécie transmissora da malária no Brasil (2–4).

Apesar dos avanços no seu controle, a malária permanece como um dos principais problemas de saúde pública, estando presente em 91 países das regiões tropicais e subtropicais do mundo (Figura 1.1), pondo em risco cerca de 61% da população mundial. No ano de 2015 foram registrados 212 milhões de casos de malária no mundo e 429 mil mortes, a maioria de crianças menores de cinco anos de idade (5). Das 429 mil mortes, cerca de 92% ocorreram na África, 6% no sudeste da Ásia e 2% na Região leste do Mediterrâneo. As mortes por malária são, em sua grande maioria, de indivíduos que contraem a infecção por *P. falciparum* (99%), no entanto vem sendo descrito casos de malária grave e morte na infecção por *P. vivax* (6–9).

Apesar da maioria dos casos ser registrado na África, as Américas contribuem com um elevado número de casos de malária. De todos os 35 países e territórios da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/PAHO), 21 (Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela) possuem áreas com risco de transmissão ativa de malária, sendo registrados 451.242 casos no ano de 2015 (10). Entre eles, o Brasil contribuiu com cerca de 24% dos casos de malária das Américas (5).

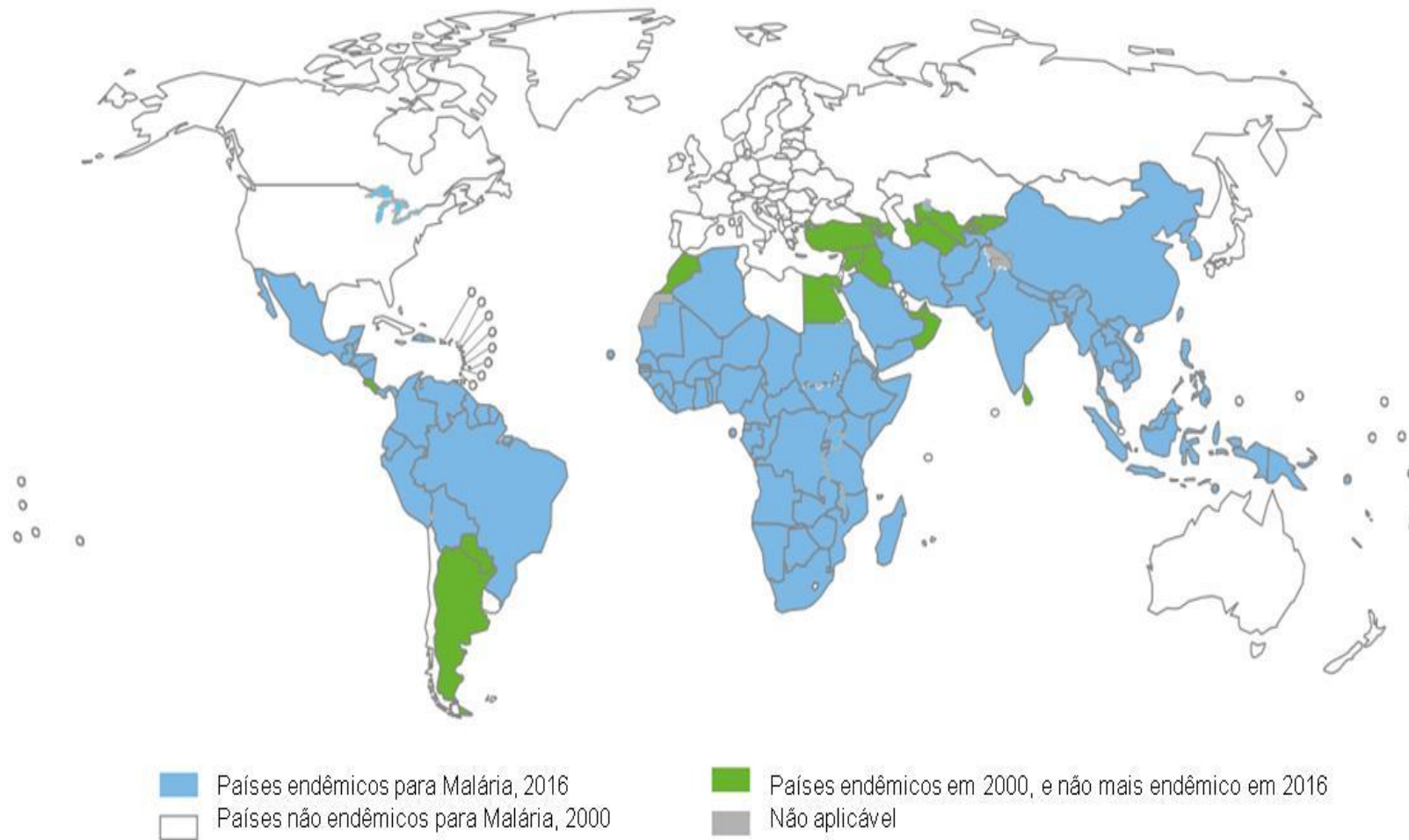


Figura 1.1: Distribuição global da malária, 2016. Fonte: Adaptado de WHO, 2016

No Brasil, em 2015, foram notificados 143.647 casos de malária, sendo a grande maioria (99,6%) na Região Amazônica, área endêmica da doença, que inclui os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 1.2). Nos outros estados, os casos registrados são quase todos importados da Região Amazônica ou de outros países onde ocorre a transmissão. De 2006 a 2016, foram registrados 1032 casos autóctones de malária no sul e sudeste do Brasil, em regiões cobertas pela Mata Atlântica (11). Cabe ressaltar que os casos de malária de Mata Atlântica no Rio de Janeiro ocorrem de forma endêmica, sendo notificados 15 casos autóctones nos quatro primeiros meses de 2017 (12). Apesar de serem poucos os casos autóctones, a doença não deve ser negligenciada, tendo em vista o risco de reintrodução intensificado pelo fluxo de migração em áreas suscetíveis, assim como o possível aumento da letalidade, devido ao diagnóstico tardio e manejo clínico inadequado (13). Apesar de o *P. falciparum*, principal causador dos casos graves e óbitos, ser proporcionalmente responsável por um número menor de casos (12%), a infecção por esta espécie é preocupante no Brasil, principalmente após a recente descrição de isolados com eficácia reduzida a derivados da artemisinina (ACT) no Suriname e Guiana Francesa (14), alertando para o risco do surgimento e introdução de resistência no Brasil.

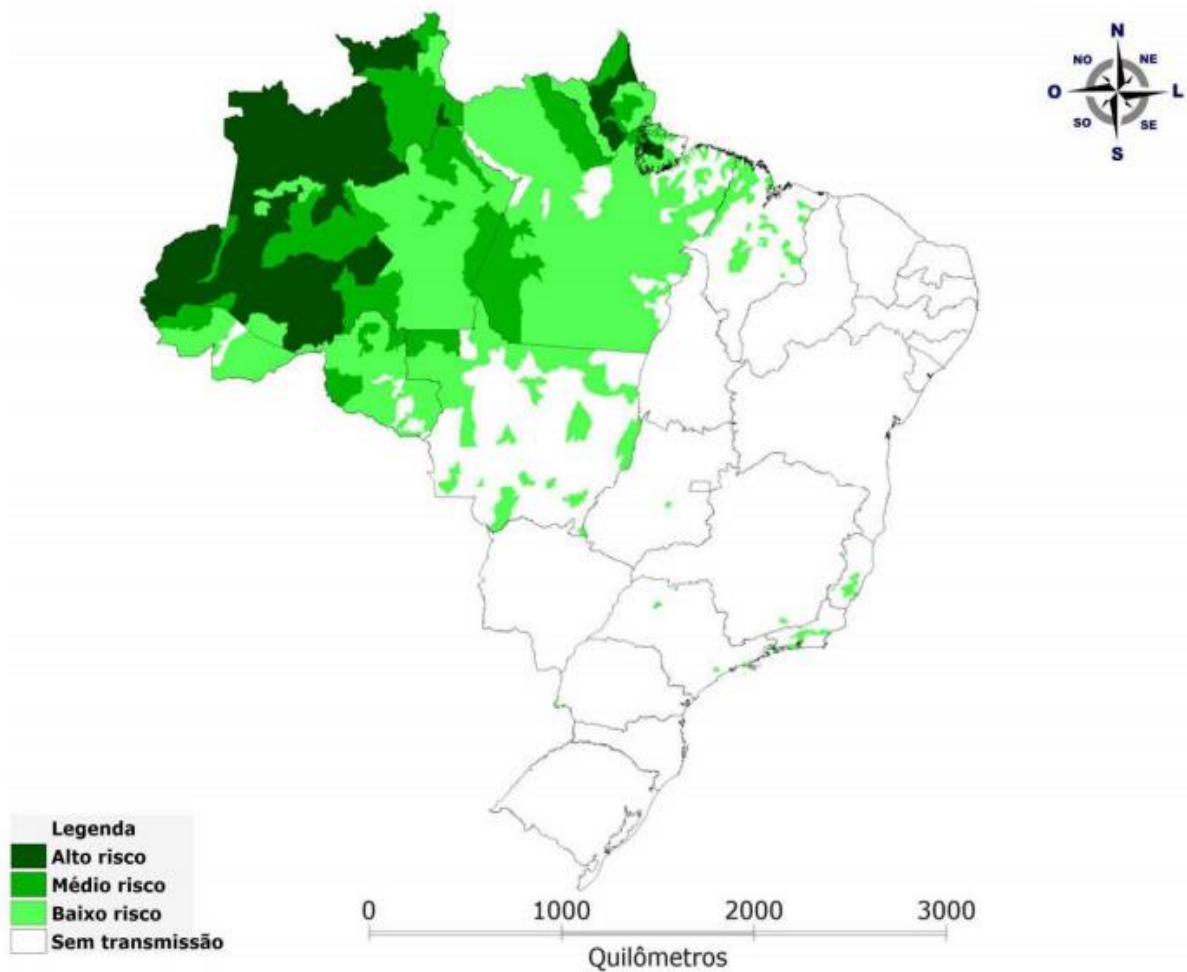


Figura 1.2: Mapa de risco da malária, Brasil, 2015. Fonte: SVS, 2016

1.2. Ciclo biológico do *Plasmodium* spp.

O ciclo evolutivo do *Plasmodium* spp. (Figura 1.3) pode ser dividido em duas fases bem distintas: uma chamada de esquizogônica ou assexuada, ocorrendo no hospedeiro vertebrado, e outra chamada de esporogônica ou sexuada, que ocorre no hospedeiro invertebrado, a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (15).

1.2.1. O ciclo no homem

A infecção no homem se inicia quando as fêmeas do mosquito infectadas, durante seu repasto sanguíneo, inoculam na pele humana os esporozoítos acumulados em suas glândulas salivares (16). Na pele, esses esporozoítos se movem ativamente, até encontrar os vasos linfáticos ou sanguíneos (17) e passam a ser transportados, passivamente, para os linfonodos, onde a maioria dos parasitos são mortos pelas células fagocíticas, ou parênquima hepático (18). Ao chegar no fígado, as moléculas de adesão do parasito reconhecem moléculas sulfatadas da membrana dos hepatócitos, às quais aderem e permite a penetração do parasito na célula hepática (19,20). Essa invasão envolve a invaginação da membrana plasmática do hepatócito e a formação de um vacúolo parasitóforo que circunda o esporozoíto (21). Além desse mecanismo, os esporozoítos também podem penetrar pela ruptura da membrana do hepatócito, que logo após a entrada do esporozoíto é reparada pela célula (22); esse mecanismo mantém-se desconhecido, entretanto uma hipótese é a secreção de lipases, proteases ou proteínas formadoras de poros pelos esporozoítos, permitindo a perfuração da membrana plasmática (23). Ao penetrar no hepatócito dessa maneira, os esporozoítos entram em contato direto com o citoplasma, e rapidamente saem da célula hepática utilizando o mesmo mecanismo (21). Ocasionalmente assim, uma migração dos esporozoítos pelas células, até penetrar um hepatócito pela invaginação da membrana plasmática, formando um vacúolo parasitóforo onde se replicam e desenvolvem, dando origem aos esquizontes hepáticos (21,22,24). Essa fase do ciclo é chamada de pré-eritrocítica, na qual, ao seu término, as células hepáticas se rompem liberando os merossomas. Esses merossomas são levados para a corrente sanguínea, onde se rompem, liberando os merozoítos capazes de invadir eritrócitos (25,26).

No ciclo do *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* nem todos esporozoítos que infectam hepatócitos entram em processo de esquizogonia. Ao invés disso, eles se desenvolvem em formas hepáticas latentes, chamadas hipnozoítos, permitindo as recaídas tardias (26).

A invasão dos merozoítos nos eritrócitos dá início ao ciclo eritrocítico, fase na qual ocorrem os sintomas clínicos da doença (27). Para a penetração do merozoíto

é necessário, primeiramente, o reconhecimento dos eritrócitos, realizado pelas Proteínas de Superfície dos Merozoítas (MSP), que também tem papel na reorientação apical do merozoíto, promovendo a interação dos ligantes presentes na extremidade apical do parasito com receptores específicos na membrana dos eritrócitos (28). Após essa interação, o parasito redireciona sua extremidade apical em direção a membrana do eritrócito, formando uma junção entre as membranas das duas células, indispensável para o processo de invasão (29,30). Em seguida, inicia-se a formação de uma protuberância na membrana do eritrócito. Da mesma forma que o esporozoíto, o merozoíto é isolado em um vacúolo parasitóforo dentro do eritrócito (25,29). No interior do vacúolo parasitóforo, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens e maduros, que se multiplicam, dando origem a esquizontes repletos de merozoítos sanguíneos (15). Com o amadurecimento do esquizonte, ocorre a lise dos eritrócitos, liberando os merozoítos sanguíneos, que invadirão novos eritrócitos (31,32). Na fase eritrocítica, ocorre a sintomatologia característica da malária, como febre, calafrios e sudorese, que acontecem devido a liberação das toxinas do parasito durante a liberação dos merozoítos (27). Após alguns ciclos eritrocíticos, alguns merozoítos ao invadirem os eritrócitos, não se desenvolvem em esquizontes, mas se diferenciam em formas eritrocíticas sexuadas do parasito, os gametócitos femininos (macrogametócitos) e os gametócitos masculinos (microgametócitos), que, ao serem ingeridos por um mosquito durante um repasto sanguíneo, dão início ao ciclo esporogônico (33).

1.2.2. O ciclo no mosquito

Ao realizar o repasto sanguíneo, as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* podem ingerir gametócitos junto com os eritrócitos (34), além de outras formas do parasito. No intestino do mosquito, com os movimentos de contração e expansão, mudança de temperatura e pH (33), os eritrócitos se rompem e os gametócitos ficam livres no intestino do mosquito. O núcleo dos microgametócitos se divide em diversas partículas de cromatina, em forma de flagelo, e, sofre o processo de exflagelação, onde os microgametas se desprendem do corpo residual e se movimentam no intestino do mosquito até encontrar o macrogameta (35,36). Com a

fusão dos gametas masculinos e femininos ocorre a fertilização, formando um zigoto diploide (33). O zigoto se desenvolve em um oocineto móvel, que migra através do epitélio do intestino do mosquito, depositando-se sobre a membrana basal, onde secreta substâncias que formam um envoltório que o diferencia em oocisto (33,34,37). O oocisto se multiplica por esporogonia, gerando milhares de esporozoítos em seu interior (38). Após completar a maturação, o oocisto se rompe liberando na hemocele do mosquito os esporozítos, que atingem as glândulas salivares do inseto (33,37,38). Ao realizar um novo repasto sanguíneo, os esporozoítos serão inoculados na pele do hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo.

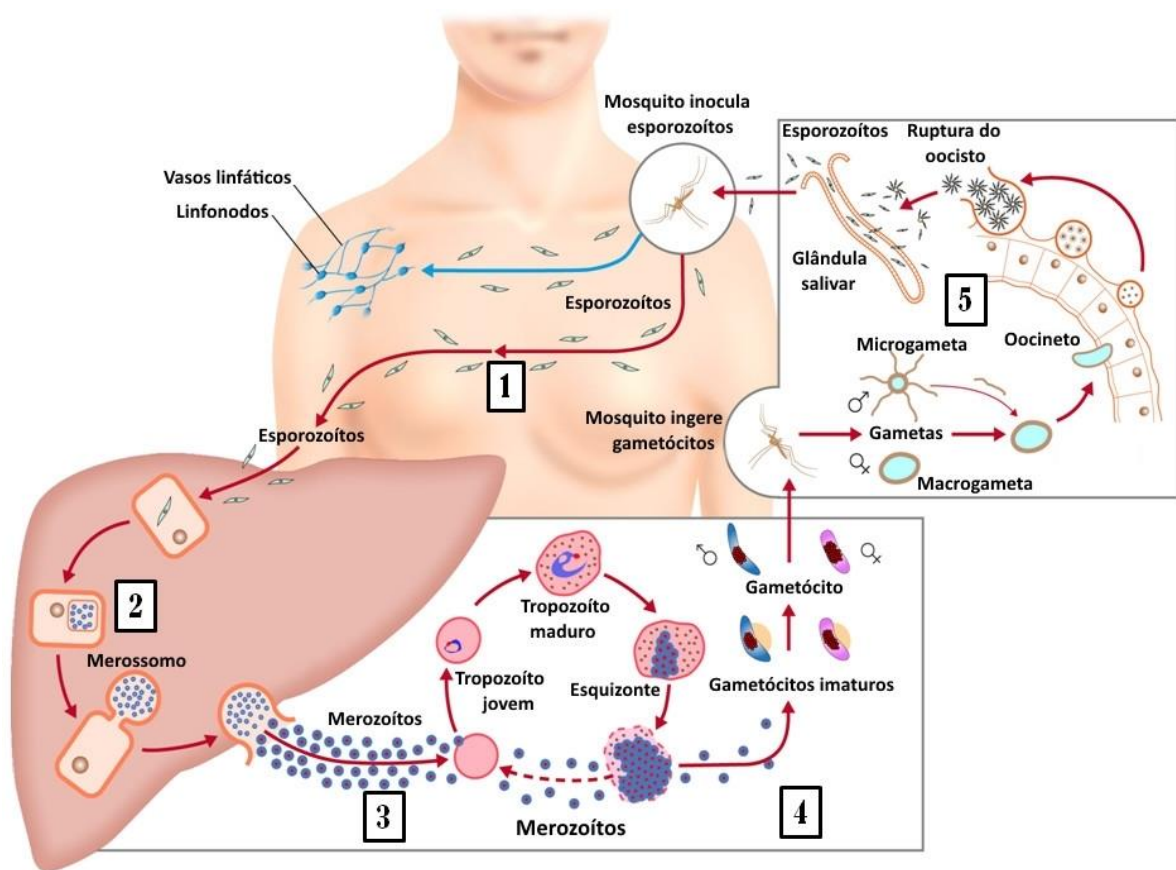


Figura 1.3: Ciclo evolutivo do *Plasmodium* spp.. 1) A infecção no homem se inicia quando as fêmeas do mosquito *Anopheles* inoculam os esporozoítos ao fazer o repasto sanguíneo. Os esporozoítos migram para o fígado pela corrente sanguínea. 2) Ao chegar no fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos e se multiplicam por esquizogonia, dando origem aos esquizontes hepáticos, as células hepáticas se rompem liberando os merossomos. 3) Os merossomos se rompem na corrente sanguínea, liberando os merozoítos, que invadem os eritrócitos e se multiplicam por esquizogonia, dando origem a esquizontes sanguíneos repletos de merozoítos. Os eritrócitos se rompem liberando os merozoítos na corrente sanguínea, que invadirão novos eritrócitos. 4) Alguns merozoítos ao invadirem os eritrócitos, se diferenciam em gametócitos, que são ingeridos pelos *Anopheles* durante o repasto sanguíneo, dando início ao ciclo esporogônico. 5) No intestino do mosquito, macrogameta e microgameta se encontram, ocorrendo a fertilização, resultando na formação de um zigoto, que se desenvolve em um oocineto móvel. O oocineto migra através do epitélio do intestino do mosquito e se deposita sobre a membrana basal, onde se diferencia em oocisto. O oocisto se multiplica por esporogonia, gerando milhares de esporozoítas que, ao final da maturação, são liberados na homolece dos mosquito e migram para as glândulas salivares. Ao realizar o resposto sanguíneo, os esporozoítos serão inoculados no hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo. Fonte: Adaptado de Garcia-Basteiro et al., 2012.

1.3. A busca por uma vacina antimalárica

Apesar das estratégias de controle da malária, fatores como a resistência dos parasitos aos antimaláricos, a falta de um diagnóstico rápido e a resistência do inseto vetor aos inseticidas dificultam o controle da doença. Uma vacina antimalárica eficaz seria uma estratégia com capacidade de causar um grande impacto no controle da doença e essencial para sua eliminação (39), pois diferentemente das outras abordagens, esta seria preventiva. Contudo, alguns obstáculos devem ser superados para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária.

As principais dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica são a complexidade do parasito, seu ciclo evolutivo e a limitada compreensão das interações com o hospedeiro (32). Durante seu ciclo evolutivo, os plasmódios passam por diferentes estágios de desenvolvimento, expressando uma variedade de antígenos característicos de cada fase, capazes de induzir respostas imunes distintas (40). Essa complexidade gera um aumento nos antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica capaz de induzir uma resposta imune protetora. Além disso, a recombinação genética, durante a reprodução sexuada no mosquito e os rearranjos no genoma do parasito nos estágios assexuados, resultam numa extensiva diversidade genética, sendo um fator importante para a evasão do parasito ao sistema imune dos hospedeiros (41).

Apesar de todos os obstáculos existentes, alguns fatos mostram que o desenvolvimento de uma vacina antimalárica é possível. A malária não gera imunidade estéril e duradora (16), entretanto, indivíduos residentes em áreas endêmicas re-expostos cronicamente a infecção desenvolvem uma imunidade clínica, primeiramente contra as formas graves da doença e depois contra as manifestações clínicas, na qual a replicação do parasito é controlada (42–44). Além disso, a administração de imunoglobulinas de indivíduos imunes em indivíduos não imunes demonstrou que essa imunidade pode ser transferida, diminuindo a parasitemia e as manifestações clínicas (32). A imunização de camundongos (45), primatas não humanos (46) e humanos (47) com esporozoítos irradiados promoveu a proteção contra o desafio com esporozoítos não irradiados, evidenciando a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina.

Considerando a complexidade do ciclo biológico desse parasito, seis alvos são considerados para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica: esporozoítos, hepatócitos infectados, merozoítos livres, eritrócitos infectados, toxinas do parasito e formas sexuadas (16,42,48).

As vacinas contra as formas pré-eritrocíticas poderiam impedir a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos, ou, ocorrendo a penetração, destruindo os hepatócitos, evitando o desenvolvimento do parasito no seu interior, bloqueando a formação de merozoítos. Dessa maneira, uma vacina contra esse estágio poderia conferir proteção contra as formas hepáticas, prevenindo o desenvolvimento da doença, visto que os sintomas clínicos se manifestam somente durante a fase eritrocítica, além de bloquear a transmissão da malária, uma vez que não haveria a formação de gametócitos (16,31,44).

As vacinas contra as formas eritrocíticas assexuadas poderiam controlar e/ou prevenir a doença, reduzindo significativamente a carga parasitária e, conseqüentemente, os sintomas clínicos, tendo um grande impacto na morbidade e mortalidade em áreas endêmicas de malária. A vacina ideal contra as formas eritrocíticas assexuadas seria capaz de induzir a produção de anticorpos que promoveriam a opsonização e destruição dos merozoítos e eritrócitos infectados. Além disso, poderiam também, bloquear a adesão de eritrócitos parasitados às células endoteliais, que está associado ao desenvolvimento de malária grave (31,32).

As vacinas contra toxinas são denominadas como vacinas antidoenças, visto que não agem sobre o desenvolvimento do parasito, somente nas manifestações clínicas. Uma vacina capaz de bloquear as toxinas poderia minimizar ou até mesmo evitar os sintomas da malária, e conseqüentemente, os casos mais graves da doença. No entanto, esse tipo de vacina deve ser utilizado numa estratégia conjunta com uma vacina contra o parasito, pois o aumento da parasitemia, mesmo na ausência dos sintomas clínicos podem levar conseqüências graves ao individuo que contraia a infecção (49).

As vacinas bloqueadoras de transmissão são aquelas contra as formas eritrocíticas sexuadas do parasito (50). Essa estratégia tem como alvo antígenos

expressos na superfície de gametócitos, zigotos ou oocinetos, e, não teria capacidade de induzir uma resposta imune protetora para o indivíduo vacinado, mas sim de impossibilitar o desenvolvimento do parasito no intestino do inseto vetor, bloqueando a fertilização e a passagem do oocineto pelo intestino médio do mosquito, podendo reduzir, ou até mesmo impedir, a produção de esporozoítos, diminuindo ou bloqueando a transmissão a outros indivíduos, principalmente em áreas de baixo nível de transmissão (44). As vacinas bloqueadoras de transmissão são chamadas de “altruísta” por não promover proteção ao indivíduo vacinado, e sim a comunidade, já que reduziria a transmissão no local (39). Assim como a vacina antitoxina, uma estratégia ideal para utilização das vacinas contra as formas eritrocíticas sexuadas seria em associação a uma vacina antiparasitária (31,32,42).

As pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina eficaz tem focado, principalmente, em determinar antígenos-alvo fundamentais para o desenvolvimento e sobrevivência do parasito. Até o momento, já foram identificados mais de 30 antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica, provenientes de diferentes estágios do ciclo evolutivo do parasito (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Principais antígenos plasmodiais candidatos a vacina antimalárica.

ALVOS	ANTÍGENOS CANDIDATOS
Esporozoíto	<p>Proteína Circumesporozoíta (CSP)</p> <p>Proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP)</p> <p>Antígeno de esporozoíto e do estágio hepático (SALSA)</p> <p>Proteína de esporozoíto rica em treonina e asparagina (STARP)</p> <p>Proteína de travessia celular de oocinetos e esporozoítos (CeITOS)</p>
Estágio pré-eritrocítico	<p>CSP</p> <p>Antígenos do estágio hepático (LSA) -1, -2 e -3</p> <p>SALSA</p> <p>STARP</p>
Merozoíto	<p>Proteína de superfície do merozoíto (MSP) -1, -2, -3, -4 e -5</p> <p>Antígeno 175 de ligação à hemácia (EBA) -175</p> <p>Antígeno da membrana apical (AMA) -1</p> <p>Proteína associada à roptria (RAP) -1 e -2</p> <p>Antígeno de repetição acidobásico (ABRA)</p> <p>Proteína de ligação ao duffy (DBP) (<i>P. vivax</i>)</p>
Estágio eritrocítico	<p>Antígeno de superfície da hemácia fase de anel (RESA)</p> <p>Proteína rica em serina (P126/SERA/SERP/P105/P113/P140)</p> <p>Proteína de membrana da hemácia (EMP) -1, -2 e -3</p> <p>Proteína rica em glutamato (GLURP)</p>
Toxinas	Glicosilfosfatidilinositol (GPI)
Estágio sexuado	Ps25, Ps28, Ps48/45, Ps230

Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados de Ouattara A & Laurens M, 2015 e Schwartz *et al.*, 2012

Para melhor compreensão da descrição dos antígenos plasmodiais candidatos a vacina, cabe fazer um breve detalhamento dos ensaios clínicos vacinais. Os ensaios clínicos vacinais avaliam a segurança e eficácia de uma candidata a vacina e, são divididos em quatro diferentes fases: I, II, III e IV (51).

Durante a Fase I a inocuidade e imunogenicidade da formulação são avaliadas, assim como o tipo de resposta imune induzida e as doses e intervalos a serem utilizados (51). Nessa fase, a formulação é administrada em poucos indivíduos residentes de áreas não endêmicas (Fase Ia) ou previamente expostos a malária residentes em áreas endêmicas (Fase Ib) (52). Se a formulação for segura, segue para os ensaios clínicos de Fase II, onde a eficácia da vacina contra a infecção ou doença é avaliada. A Fase II é dividida em Fase IIa e IIb. Na Fase IIa indivíduos residentes em áreas não endêmicas, sem exposição previa a malária, após imunização, são desafiados através da picada de mosquitos de laboratório carregando esporozoítos em suas glândulas salivares e sua eficácia é avaliada pela capacidade do indivíduo evitar ou retardar a infecção. Ao primeiro sinal de infecção, os voluntários são rapidamente tratados com antimaláricos. Na Fase IIb, um limitado número de indivíduos residentes em áreas endêmicas são expostos ao desafio natural após imunização e sua eficácia é avaliada pela capacidade dos indivíduos evitarem a infecção ou possuírem menos infecções, em um determinado período, em relação a um grupo controle não vacinado (52). As candidatas vacinais que obtiverem sucesso nessa fase seguem para os ensaios clínicos de Fase III. Durante a Fase III a eficácia é avaliada em larga escala. Nessa fase, uma determinada população de área endêmica é imunizada e a eficácia da vacina é avaliada pela porcentagem da redução na incidência (de doença ou infecção) em relação a uma população não vacinada vivendo sob as mesmas condições epidemiológicas (51). A eficácia de uma vacina pode variar em diferentes cenários epidemiológicos, assim se torna necessário a realização de ensaios clínicos em diferentes regiões, evidenciando a segurança e eficácia para licenciamento da vacina (52). A Fase IV envolve o monitoramento de segurança, eficácia e longevidade da proteção (51). Nessa fase, a vacina será administrada em populações maiores, provavelmente associada a outras vacinas, para possíveis interferências serem avaliadas de maneira apropriada.

A busca por vacinas antimaláricas foi impulsionada na década de 1960, quando descrito pela primeira vez, por Nussenzweig e colaboradores, que camundongos imunizados com esporozoítos atenuados por irradiação ficavam protegidos contra o desafio com esporozoítos não-irradiados (53). Posteriormente, o mesmo foi observado em primatas não humanos (46) e humanos (47).

Apesar de estudos demonstrarem que esporozoítos irradiados são poderosos imunógenos, sua utilização na vacinação em massa era inviável até pouco tempo atrás (54), visto que para a realização de ensaios de ampla magnitude eram necessários que um grande número de esporozoítos fossem dissecados das glândulas salivares dos mosquitos, purificados, criopreservados e subsequentemente administrados por vias de vacinações aceitáveis. Com os avanços tecnológicos, a maioria dessas limitações já foram solucionadas (32), entretanto, a via de administração permanece sendo um problema, considerando que a proteção duradoura só foi observada utilizando a via intravenosa (40,54), e essa seria inadmissível para vacinas preventivas (44). Outras alternativas para a utilização de esporozoítos atenuados vem sendo desenvolvidas, como a atenuação genética e, o uso de esporozoítos atenuados em combinação com cloroquina (55). Ainda assim, a PfSPZ é uma candidata a vacina antimalárica em destaque, estando, atualmente, em ensaios clínicos de fase IIb. A PfSPZ consiste em esporozoítos atenuados por radiação. Ensaios clínicos demonstraram que a imunização com esporozoítos atenuados induziu altos níveis de proteção estéril (80%) em ensaio controlado de infecção com malária humana (CHMI) com parasitos homólogos (56–59). Posteriormente foi demonstrado que quatro doses da PfSPZ conferiram aproximadamente 55% de proteção estéril, até 14 meses após a última imunização (60). Recentemente, foi observado que 64% dos indivíduos imunizados com três doses da PfSPZ permaneceram não parasitados após o ensaio de CHMI com parasitos homólogos. Esses voluntários foram submetidos novamente ao ensaio de CHMI com parasitos heterólogos e 83% dos indivíduos permaneceram não parasitados 33 semanas após a última imunização, sendo detectado em todos os indivíduos respostas de células T e anticorpos específicos contra a PfSPZ (54)

A concentração dos estudos na resposta protetora induzida pela utilização de esporozoítos atenuados levou a identificação da proteína circumesporozoíta (CSP) (42). A CSP é a principal proteína de superfície do esporozoíto, sendo expressa

também nos primeiros estágios no fígado (45), e se tornou o principal alvo para desenvolvimento de uma vacina pré-eritrocítica (31). Foram realizadas diversas construções baseadas na CSP com limitada eficácia, até que, na década de 1980, foi desenvolvida a RTS,S (55).

A RTS,S, atualmente, é a única vacina que alcançou os ensaios clínicos de fase III. Essa consiste na região repetitiva central (constituída por repetições de 4 aminoácidos – Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina, NANP –, epítipo imunodominante de célula B) e C-terminal (incluindo epítipos de célula T) da CSP fusionada a região N-terminal do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e uma porção HBsAg livre, expressos em *Saccharomyces cerevisiae* (27). Durante os ensaios clínicos de fase II, a RTS,S demonstrou uma eficácia de, aproximadamente, 32% a 57% em adultos sem histórico de malária, e o mesmo foi observado em adultos africanos (61–64). Entretanto, na Gambia, essa proteção foi de curta duração (61). Ainda durante os ensaios clínicos de fase II, foi observada, em Moçambique, uma proteção de 32% e 38%, contra as manifestações clínicas e malária grave, respectivamente, em crianças (65). Nos ensaios clínicos de fase III, resultados semelhantes vem sendo demonstrados. Em recém-nascidos foi observado, aproximadamente, 27% de proteção contra as manifestações clínicas, durante 20 meses, sendo reduzida para 18% em 4 anos. Em grupos de crianças de 5 a 17 meses, foi observada uma proteção de até 45% em 20 meses, decaindo para 28% em 4 anos. Entretanto, casos inexplicáveis de meningite foram observados (55,66,67). É importante enfatizar que a proteção conferida pela RTS,S tem sido associada a altos níveis de anticorpos IgG específicos e células T CD4⁺ contra a CSP.

Outra vacina pré-eritrocítica em destaque é a ChAd63/MVA ME-TRAP, atualmente em ensaios clínicos de fase IIb. A ChAd63/MVA ME-TRAP consiste em múltiplos epítipos de diversos antígenos pré-eritrocíticos fusionados ao alelo T9/96 da TRAP, codificada nos vetores Adenovírus simiano sorotipo 63 (ChAd63) e vírus vaccínia Ankara modificado (MVA) (40). Essa vacina se mostrou segura e imunogênica, capaz de induzir resposta de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em indivíduos sem histórico de malária (68) e previamente expostos no Quênia e Gâmbia (69–71), além de crianças e recém-nascidos em Gâmbia e Burquina (72). No Quênia, foi

observada uma eficácia de 67% contra a infecção malárica, entretanto essa proteção foi parcial (71).

A MSP3-LSP é uma candidata a vacina antimalárica eritrocítica e, atualmente, está em ensaios clínicos de Fase IIb. A MSP3-LSP é derivada da região C-terminal da Proteína-3 de Superfície do Merozoíto. Essa candidata vacinal demonstrou ser segura e imunogênica em indivíduos sem histórico de malária (73), adultos semi-imunes e crianças residentes em áreas endêmicas (74–76). Ensaios clínicos revelaram que a MSP3-LSP induziu altos níveis de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) (75,76), capazes de inibir o crescimento do parasito *in vitro* e *in vivo* (77).

A GMZ2 é uma proteína recombinante expressa em *Lactococcus lactis*, contendo os fragmentos conservados da região C-terminal da MSP-3 e N-terminal (R0) da GLURP (78). Ensaios clínicos tem demonstrado que a GMZ2 é bem tolerada, segura e imunogênica e que os elevados títulos de anticorpos IgG citofílicos induzidos após imunização são específicos e funcionais, capazes de controlar o crescimento *in vitro* de *P. falciparum* em presença de monócitos (79–83). Além disso, foram demonstrados alta prevalência e títulos de anticorpos naturalmente adquiridos contra a GMZ2 e seus componentes em indivíduos residentes em área de alta endemicidade de malária na África (80,82,84). Acredita-se que a GMZ2 possui um efeito sinérgico, visto que foram observados maiores títulos de anticorpos contra ela quando comparado aos seus fragmentos individuais (84). Ensaios clínicos tem demonstrado a baixa eficácia de GMZ2, entretanto, pode ter um grande impacto no combate a malária, principalmente se combinada a uma candidata bloqueadora de transmissão (78).

Muitos antígenos plasmodiais identificados já foram testados em ensaios pré-clínicos e clínicos, até de fase III (Tabela 1.2) (16,31,44,45,49,55,67,71,72,75,76,80,81,83,85–93), entretanto, nenhum deles gerou uma perspectiva sólida de que uma vacina possa estar disponível nos próximos anos (31,39,45,94).

Tabela 1.2: Principais ensaios clínicos com candidatas a vacina antimalárica.

CANDIDATO	FASE ATUAL	FORMULAÇÃO	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
RTS,S	Fase III	Regiões repetitivas e C-terminal da CSP fusionada com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg)	Aproximadamente 30% a 50% de eficácia. 49% de redução de casos graves.	(31,55,67)
ChAd63/MVA ME-TRAP	Fase IIb	Múltiplos epítomos fusionados a proteína TRAP codificada nos vetores Adenovírus simiano sorotipo 63 (ChAd63) (prime) e vírus vaccínia Ankara modificado (MVA) (boost)	Segura e imunogênica, induzindo altos níveis de resposta de células T. 21% de proteção estéril. 67% de eficácia contra a infecção.	(67,71,72)
PfSPZ	Fase IIb	Esporozoítos atenuados por radiação.	>80% proteção estéril contra o ensaio controlado de infecção humana e de curta duração.	(56–59)
PfCelTOS FMP012	Fase Ia	CelTOS expressa em <i>E.coli</i>	Proteção estéril e, de espécies cruzadas, induzindo potentes respostas celular e humoral, em camundongos.	(86,92)
CSVAC	Fase Ia	CSP codificada nos vetores ChAd63 (prime) e MVA (boost)	Segura e imunogênica, induzindo altos níveis de resposta de células T. Resposta IgG modesta, porém persistente.	(89)

Tabela 1.2: (Continuação) Principais ensaios clínicos com candidatas a vacina antimalárica.

CANDIDATO	FASE ATUAL	FORMULAÇÃO	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
GMZ2	Fase Ib/IIb	Proteína recombinante contendo os fragmentos N-terminal da GLURP e C-terminal da MSP-3 expressa em <i>Lactococcus lactis</i>	Segura, imunogênica e bem tolerada em adultos e crianças africanas. Induziu a produção de anticorpos IgG específicos e funcionais.	(80,81,83)
MSP3-LSP	Fase IIb	Peptídeo sintético longo da MSP-3 e adjuvante alum.	Bem tolerada, segura e imunogênica. Altos níveis de anticorpos IgG citofílicos funcionais.	(75,76,85)
SE36	Fase Ib	Domínio N-terminal do Antígeno repetitivo de serina (SERA5) expresso em <i>E. coli</i> e adjuvante alum	Bem tolerada e segura. Imunogênica em chimpanzés, com títulos de anticorpos IgG por mais de um ano.	(87,88)
ChAd63/MVA Pfs25- IMX313	Fase Ia	Pfs25 fusionada a IMX313 codificada nos vetores ChAd63 (prime) e MVA (boost)	Produção de anticorpos IgG específicos funcionais em camundongos, com forte atividade bloqueadora de transmissão.	(91)

1.4. Papel dos anticorpos na infecção malárica

Indivíduos residentes em áreas de alta endemicidade de malária desenvolvem uma imunidade clínica, primeiro contra os casos graves e depois contra a doença (16,39,43,44). Esse tipo de imunidade clínica foi chamado de premunição (95). A premunição requer anos de exposição contínua para ser desenvolvida e não é estéril (44). Além disso, é de curta duração, se um indivíduo semi-imune sai da área endêmica essa imunidade protetora é perdida (16,43).

A imunidade protetora adquirida contra a malária está associada tanto a resposta imune humoral, quanto celular. Acredita-se que a resposta imune celular é essencial para controlar a infecção pré-eritrocítica, enquanto os anticorpos são primordiais para conter o estágio eritrocítico da doença (16). Anticorpos possuem diversas funções (Figura 1.4) e podem agir sozinhos bloqueando processos importantes para o parasito e/ou em cooperação com células do sistema imunológico do hospedeiro (96). Durante a fase pré-eritrocítica, os anticorpos podem agir sobre os esporozoítos reduzindo sua travessia pela pele, sua invasão aos hepatócitos e, opsonizando-os para promover a fagocitose (96), entretando, existem mais evidencias de suas funções no decorrer da fase eritrocítica.

Durante o estágio sanguíneo da infecção os anticorpos podem atuar:

- I. Inibindo a invasão do eritrócito, o crescimento intra-eritrocítico do parasito ou a ruptura do esquizonte. Anticorpos podem bloquear proteínas fundamentais no processo de invasão, impedindo a invasão do merozoíta no eritrócito (97) ou conter o desenvolvimento do parasito e, conseqüentemente, a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea (96,98);
- II. Opsonizando merozoítos e eritrócitos infectados para fagocitose. Anticorpos podem se ligar a antígenos de superfície de merozoítos e eritrócitos infectados, facilitando seu reconhecimento pelas células fagocíticas, levando a morte e remoção dos parasitos e células parasitadas (96,99,100);

- III. Através do mecanismo de inibição do crescimento dependente de anticorpo (ADCI). Anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) se ligam a antígenos de superfície de merozoítos e interagem com os receptores Fc de monócitos, ativando-os. Após a ativação, os monócitos liberam fatores solúveis, com efeito parasitostático, que impede o desenvolvimento do parasito (96);
- IV. Através do mecanismo de explosão respiratória dependente de anticorpos (ADRB). Merozoítos opsonizados podem interagir com neutrófilos, *in vitro*. Após sua ativação, os neutrófilos passam a produzir espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicas para os parasitos, impedindo seu desenvolvimento intra-eritrocítico (96,101);
- V. Através da ativação do sistema complemento. Anticorpos específicos podem se ligar a superfície dos merozoítos e à primeira molécula da via clássica do complemento, C1q. Esse complexo merozoíta-anticorpo-C1q ativa a cascata do sistema complemento acarretando na lise do merozoíta (102);
- VI. Inibindo a adesão de hemácias parasitadas ao endotélio vascular e a formação de rosetas. Anticorpos contra antígenos específicos de superfície de eritrócitos infectados podem bloquear o sequestro de eritrócitos infectados no endotélio vascular. Além disso, podem impedir a ligação dos eritrócitos infectados e não infectados, fato importante, considerando que a adesão e formação de rosetas está associada aos casos de malária grave (96);
- VII. Inibindo a ruptura de esquizontes. Anticorpos específicos contra antígenos de superfície de eritrócitos infectados por esquizontes podem inibir sua ruptura e, conseqüentemente, a liberação de merozoítos, podendo reduzir a parasitemia (103);
- VIII. Neutralizando toxinas. Anticorpos podem neutralizar moléculas pró-inflamatórias liberadas pelo parasito após a ruptura dos esquizontes,

como Glicosilfosfatidilinositol (GPI), diminuindo as manifestações clínicas da doença (32);

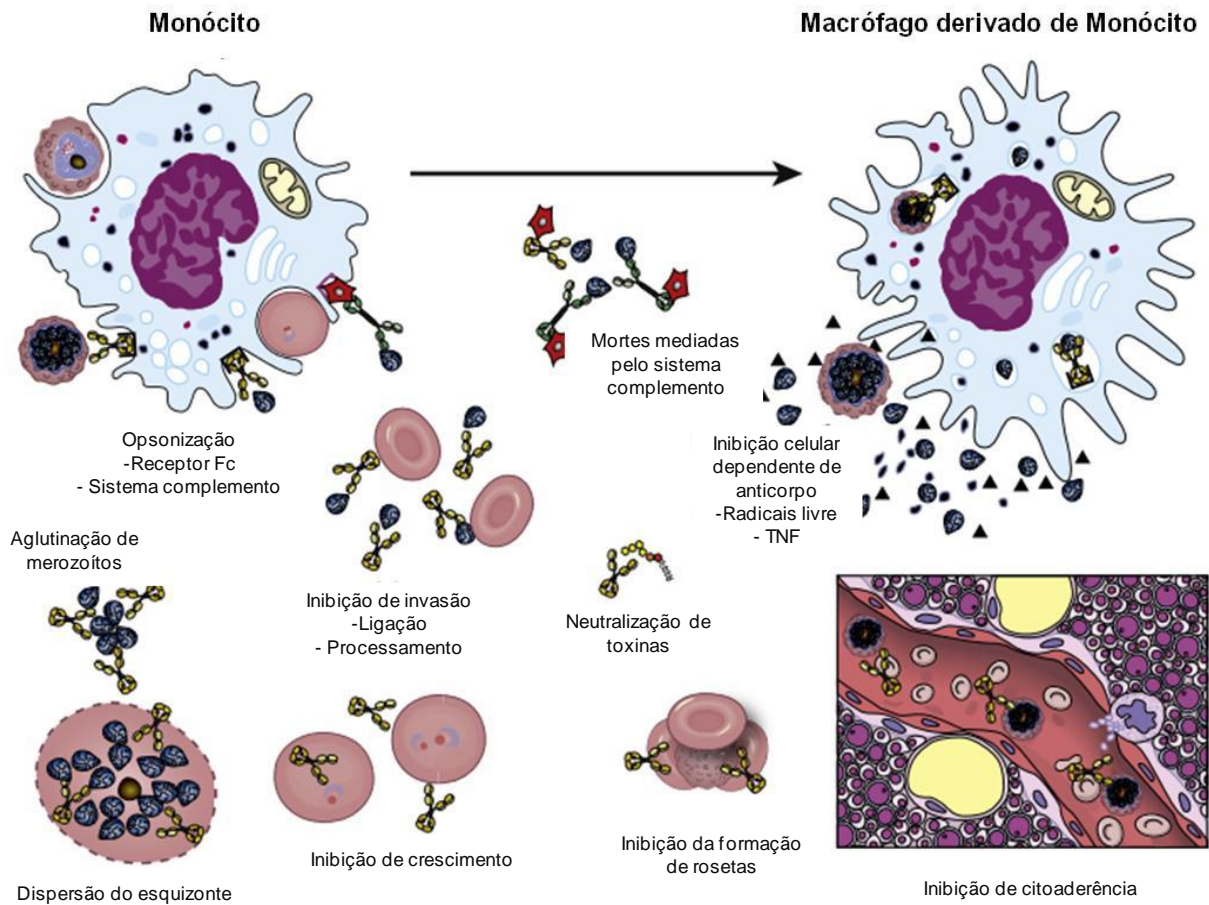


Figura 1.4: Representação esquemática de mecanismos mediados por anticorpos na imunidade contra as formas eritrocíticas do *P. falciparum*.

Anticorpos contra merozoítos podem: (i) prevenir a invasão de eritrócitos; (ii) ativar sistema complemento; (iii) opsonizar merozoítos e (iv) estimular monócitos e macrófagos para liberar moléculas parasitostáticas, matando parasitos intra-eritrocíticos. Anticorpos contra eritrócitos infectados podem: (i) inibir a citoaderência, (ii) impedir a formação de rosetas, (iii) opsonizar eritrócitos infectados e (iv) inibir o desenvolvimento intracelular do parasito. TNF: Fator de necrose tumoral. Fonte: Adaptado de Teo *et al.*, 2016.

1.5. A proteína recombinante GMZ2.6c

A candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c (Figura 1.5) é uma proteína recombinante expressa em *L. lactis*. Assim como a GMZ2, contém os fragmentos conservados da região C-terminal da MSP-3 e N-terminal (R0) da GLURP, além do fragmento C-terminal (6c) do Antígeno de Pré-fertilização 48/45 (Pfs48/45) de *P. falciparum*, sendo uma candidata a vacina multiestágio.

Esses antígenos foram selecionados como candidatos vacinais a partir de um racional que utilizou vários parâmetros. A maioria dos critérios correspondeu aos comumente utilizados para antígenos candidatos vacinais, como a imunogenicidade em condições naturais de exposição, a correlação dos títulos de anticorpos específicos com os diversos graus de proteção clínica de indivíduos vivendo em área endêmica e o papel funcional de anticorpos específicos de inibir o crescimento *in vitro* de *P. falciparum* (104–116).

Estudos preliminares realizados em camundongos mostraram que a imunização com a GMZ2.6c foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos específicos e células T CD4⁺ produtoras de Interferon gama (IFN- γ) e Fator de necrose tumoral (TNF) (117).



Figura 1.5: Representação esquemática da proteína recombinante GMZ2.6c de *P. falciparum*, indicando a região N-terminal da GLURP, a região C-terminal da MSP-3 e o fragmento 6c da Pfs48/45. Em laranja estão identificados os resíduos Arginina-Serina (RS) e em marrom a etiqueta de poli-histidina. Fonte: Elaborado pela autora.

1.5.1. Proteína Rica em Glutamato (GLURP)

A Proteína Rica em Glutamato (GLURP) é expressa em todos os estágios do *P. falciparum* no hospedeiro vertebrado, estando presente no vacúolo parasitóforo dos esquizontes hepáticos e sanguíneos, na superfície dos merozoítos (118), e no

citoplasma de eritrócitos parasitados com gametócitos (119), sendo liberada com a ruptura dos esquizontes (118).

A GLURP possui uma sequência N-terminal não repetitiva (R0), e duas sequências repetitivas central (R1) e C-terminal (R2) (Figura 1.6) (118,120). A região R0 é altamente conservada em isolados de diferentes regiões geográficas (121), enquanto a R2 possui um elevado grau de polimorfismo, associado ao número de repetições das sequências repetitivas, sendo observado até 20 alelos em áreas de alta endemicidade (122–126).

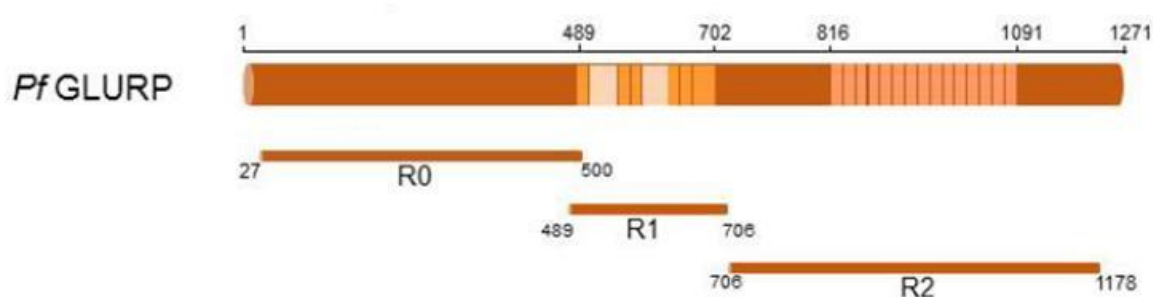


Figura 1.6: Representação esquemática da Proteína GLURP de *P. falciparum*, mostrando as regiões N-terminal (R0), central (R1) e C-terminal (R2). Fonte: Theisen et al., 2017.

Em trabalhos realizados em áreas de alta endemicidade na África, foi observado que indivíduos clinicamente imunes possuíam altos títulos de anticorpos naturalmente adquiridos contra a GLURP (110,127,128), capazes de controlar a carga parasitária e, consequentemente, a doença (129,130). Além disso, em teste clínico de fase I com a GLURP₈₅₋₂₁₃, a imunização induziu anticorpos específicos capazes de inibir o crescimento *in vitro* do parasito (131).

A resposta imune contra a GLURP é predominantemente citofílica (IgG1 e IgG3) (109,131–134), anticorpos citofílicos podem agir em cooperação com os monócitos através do mecanismo de inibição do parasito dependente de anticorpos (ADCI). Estudos tem demonstrado que a região imunodominante da GLURP é a R2 (127,135), e, anticorpos anti-R0 são mais eficazes no mecanismo de ADCI (108).

Estudos realizados em indivíduos residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira mostraram uma prevalência de 67% e 79% de anticorpos contra as regiões R0 e R2, respectivamente (111), e que os anticorpos contra a região R0 foram capazes de inibir o crescimento do *P. falciparum in vitro* (115).

1.5.2. Proteína 3 de Superfície de Merozoíto (MSP-3)

A Proteína 3 de Superfície de Merozoíto (MSP-3) de *P. falciparum* é sintetizada durante o estágio de esquizonte como um precursor de peso molecular variável e liberada no vacúolo parasitóforo, onde sofre processamento proteolítico. Alguns fragmentos estão associados a superfície dos merozoítos, porém a maioria é liberada na circulação sanguínea e no sobrenadante de cultura *in vitro* com o rompimento do esquizonte (136).

A MSP-3 possui uma região N-terminal composta de três blocos de quatro repetições de um heptapeptídeo, separados por regiões não repetitivas e, uma região C-terminal rica em resíduos de ácido glutâmico, seguido por outro motivo de repetição hepta “*heptad repeats*” semelhante ao encontrado nos zíperes de leucina (Figura 1.7) (136). Estudos tem demonstrado que a MSP-3 possui um limitado número de polimorfismo em isolados de diferentes regiões geográficas, sendo sua maioria na região N-terminal, entretanto, a estrutura geral é conservada (137–140).

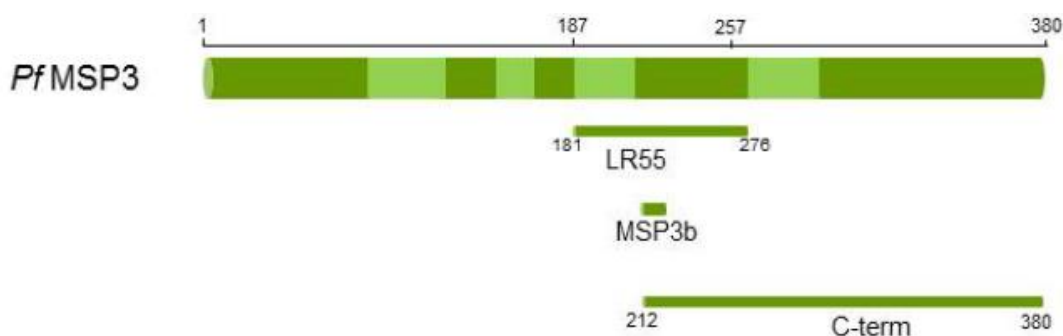


Figura 1.7: Representação esquemática da proteína MSP-3 de *P. falciparum*, mostrando a região C-terminal e os peptídeos LR55 e MSP3b, utilizados nos ensaios imunológicos. Fonte: Theisen *et al.*, 2017.

Foi observado que indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária, possuíam anticorpos contra a MSP-3, e que indivíduos que possuíam uma imunidade clínica tinham uma predominância de anticorpos citofílicos, enquanto aqueles não imunes apresentavam prevalência de anticorpos IgG2 e IgM (106), sugerindo que esses anticorpos poderiam estar competindo pelo antígeno, impedindo o mecanismo de ADCI mediado pelos anticorpos IgG1 e IgG3. Cabe ressaltar que, anticorpos de indivíduos clinicamente imunes foram capazes de interagir com monócitos, através do mecanismo de ADCI e inibir o crescimento do *P. falciparum in vitro* (141). Além disso, em teste clínico de fase I com a MSP-3, a imunização induziu altos níveis de anticorpos específicos capazes de inibir o crescimento *in vitro* do parasito, assim como os anticorpos naturalmente adquiridos (73).

1.5.3. Antígeno de Pré-fertilização 48/45 (Pfs48/45)

O Antígeno Pré-fertilização 48/45 (Pfs48/45) é expresso na superfície dos gametócitos presentes na circulação sanguínea. Durante o repasto sanguíneo, o *Anopheles* pode ingerir eritrócitos parasitados com gametócitos. No intestino do mosquito esses eritrócitos se rompem, expondo o Pfs48/45 (117). O Pfs48/45 possui um papel fundamental na fertilização do macrogametócito pelo microgametócito, um aspecto importante no sucesso da reprodução sexuada do parasito (142,143), sendo, portanto, considerada uma candidata a vacina bloqueadora de transmissão (144–146).

O Pfs48/45 é uma proteína rica em cisteína, que possui uma região C-terminal (Epítipo I), uma região central (contendo os epítipos IIb e III) e uma região N-terminal (Epítipo V) (Figura 1.8) (147). Proteínas provenientes de estágios sexuais sofrem uma menor pressão do sistema imune, conseqüentemente, possuem um menor número de polimorfismos. Estudos demonstraram que os epítipos I, IIb e III são altamente conservados em diferentes isolados, enquanto um limitado número de polimorfismo é observado nos epítipos IIa e IIc (107).

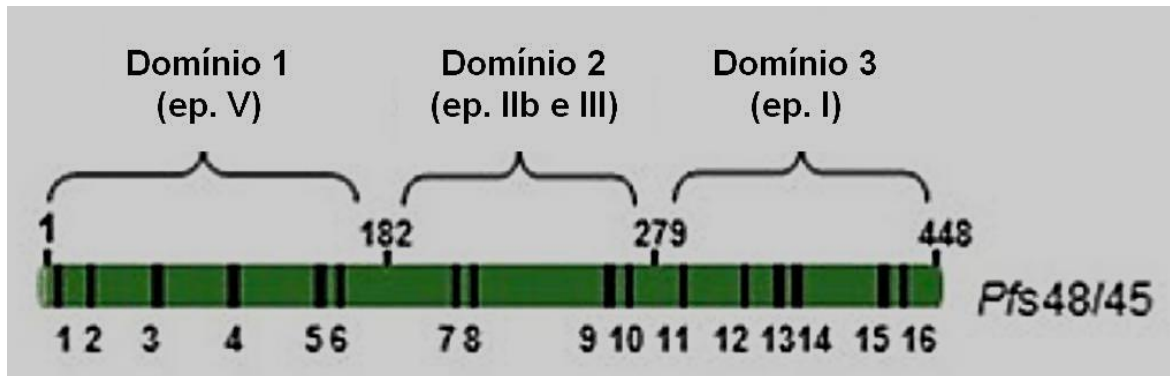


Figura 1.8: Representação esquemática da proteína Pfs48/45 de *P. falciparum* mostrando os domínios 1 (contendo o epítipo V), 2 (contendo os epítipos IIb e III) e 3 (contendo o epítipo I); as barras representam a localização dos resíduos de cisteína. ep.: epítipo. Fonte: Theisen *et al.*, 2017.

Apesar do limitado conhecimento sobre a indução ou longevidade da resposta imune contra o Pfs48/45 (143), estudos tem mostrado que indivíduos residentes em áreas endêmicas possuem anticorpos naturalmente adquiridos contra o Pfs48/45, e esses anticorpos apresentam atividade de redução de transmissão (TRA) (114,143,147,148). Além disso, a imunização de camundongos e primatas não humanos com o Pfs48/45 induziu altos títulos de anticorpos capazes de bloquear a transmissão em até 93% (144,145). Esses dados justificam o Pfs48/45 como um potente candidato a vacina bloqueadora de transmissão e, sua fusão a proteína recombinante GMZ2.

2. JUSTIFICATIVA

Estima-se que ocorram cerca de 210 milhões de novos casos e mais de 300 mil mortes todos os anos no mundo devido a malária, a maioria de crianças menores de 5 anos de idade. O desenvolvimento de novas armas de combate a essa endemia é de grande prioridade para o bem-estar e a melhoria do índice de desenvolvimento humano das populações afetadas. Uma vacina eficaz é, possivelmente, a arma mais potente para reduzir de forma drástica essas estatísticas inaceitáveis.

A GMZ2 é uma candidata a vacina antimalárica que está sendo utilizada em ensaios vacinais de fase II. Ensaios clínicos mostraram que a GMZ2 é bem tolerada, segura e imunogênica e que os anticorpos induzidos após imunização foram específicos e funcionais, capazes de controlar o crescimento *in vitro* do *P. falciparum* em presença de monócitos. Além disso, foram demonstrados alta prevalência e títulos de anticorpos naturalmente adquiridos contra a GMZ2 em indivíduos residentes em área de alta endemicidade de malária na África. É importante, entretanto, verificar se o mesmo potencial é apresentado pelas populações-alvo no Brasil, uma vez que os parasitos circulantes aqui são geneticamente distintos daqueles na África e também porque a constituição genética da população pode influenciar na resposta imune aos antígenos vacinais.

O papel protetor dos anticorpos antiplasmodiais em seres humanos tem sido demonstrado desde os experimentos realizados por Cohen e colaboradores (149) utilizando soro de adultos imunes em crianças com malária, que mostraram acentuado efeito no tratamento com anticorpos, tanto na diminuição da parasitemia quanto na melhora dos sintomas clínicos. Nosso Laboratório tem avaliado o perfil da resposta imune contra antígenos de *P. falciparum* em populações da Amazônia brasileira visando identificar o potencial antigênico e imunogênico de moléculas que possam fornecer informações que contribuam para o delineamento de estratégias vacinais. Até o momento, não há nenhum estudo sobre a antigenicidade ou imunogenicidade da GMZ2.6c em humanos. Assim, nos propomos a avaliar o perfil da resposta anticorpo contra a candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes, GLURP-R0, MSP-3 e Pfs48/45-6C, em indivíduos residentes em

áreas endêmicas brasileiras de malária, visto que a eficácia de uma vacina pode variar em diferentes cenários epidemiológicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar o potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em indivíduos cronicamente expostos à malária residentes em áreas endêmicas da Amazônia brasileira com diferentes níveis de transmissão.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar o perfil de anticorpos (IgG e subclasses, IgM, IgE e IgA) de indivíduos naturalmente expostos à infecção malárica residentes em áreas endêmicas da Amazônia brasileira, que reconhecem a proteína recombinante GMZ2.6c.
- Avaliar o perfil da resposta imune humoral (IgG e subclasses, IgM, IgE e IgA) contra os componentes da proteína recombinante GMZ2.6c (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em indivíduos naturalmente expostos à infecção malárica residentes em áreas endêmicas da Amazônia brasileira.
- Identificar e validar os epítomos B imunodominantes das proteínas MSP-3, GLURP e Pfs48/45 nas populações estudadas.
- Avaliar a relevância dos componentes da proteína recombinante GMZ2.6c (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) no processo de aquisição de uma imunidade antiparasitária pela análise do perfil da resposta imune humoral e pelos dados pessoais, clínicos e epidemiológicos.

4. METODOLOGIA

4.1. Descrição das áreas

O estudo foi concentrado nas cidades de Mâncio Lima (07°36'49''S e 72°53'47''W) e Cruzeiro do Sul (07°37'50''S e 72°40'13''W), no estado do Acre e Guajará (02°58'18''S e 57°40'38''W) no estado do Amazonas (Figura 4.1). O estado do Acre está localizado no sudoeste da Amazônia brasileira, ocupa uma área de 164.221,36 km², correspondendo a 4% da Região Amazônica brasileira e a 1,9% do território nacional. O Amazonas ocupa uma área de 1.570.745.680 km², correspondendo aproximadamente a 30% da Região Amazônica brasileira e representando 18,5% do território nacional.

As cidades de Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul e Guajará estão categorizadas entre as 10 que concentram 70% da malária causada pelo *P. falciparum* no país (4^a, 1^a e 9^a, respectivamente) e serão alvos prioritários de ações do Ministério da Saúde (MS) que priorizam a eliminação do *P. falciparum* do Brasil. Elas registraram em 2014, respectivamente, 1432, 5447 e 674 casos de malária, com um Índice Parasitário Anual (IPA) de *P. falciparum* de 85.3, 67.3 e 43.3 / 1000 habitantes em Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul e Guajará, respectivamente (Figura 4.2). Para referência, áreas com IPA ≥ 50 são consideradas de alto risco de transmissão.

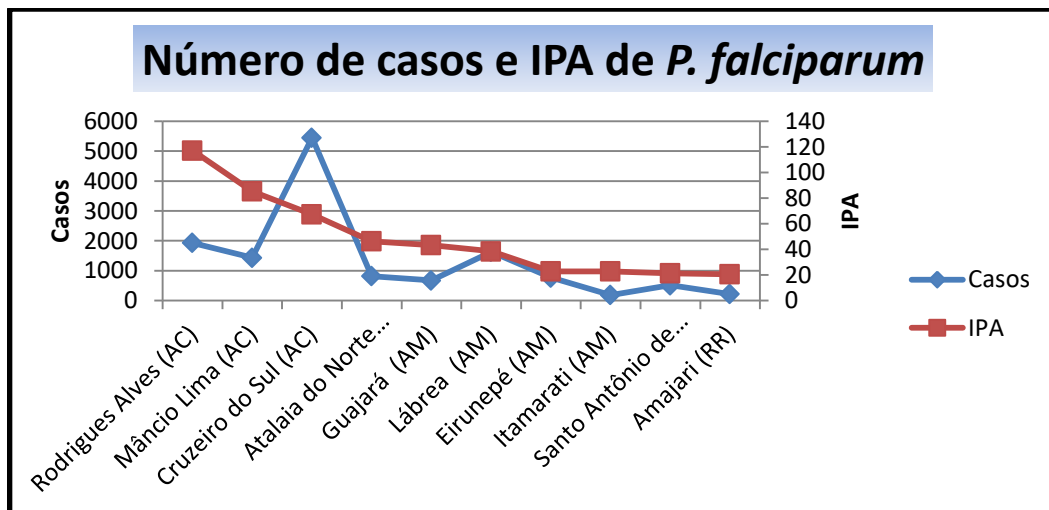


Figura 4.2: Número de casos e Índice Parasitário Anual (IPA) das 10 cidades com maior incidência de malária por *Plasmodium falciparum* no Brasil. Fonte: SVS, 2016.

O trabalho de campo foi realizado com o apoio da Coordenação de Endemias de Cruzeiro do Sul, de Mâncio Lima e de Guajará no período de junho a agosto de 2016. Em Mâncio Lima (Figura 4.3), indivíduos que procuravam assistência médica no Hospital Dr. Abel Pinheiro Maciel Filho foram convidados a participar do estudo (Figura 4.4). Além da busca passiva, também foi realizada busca ativa em colaboração com a equipe de agentes de saúde da Unidade de Saúde da Família Sofia de Almeida Barreto (Figura 4.5). Em Cruzeiro do Sul (Figura 4.6) foram realizadas busca ativa - em colaboração com os Agentes de Saúde – e passiva dos pacientes que procuravam assistência na Unidade de Saúde Gilmar Cândido da Silva, localizado em Lagoinha (Figura 4.7). Em Guajará (4.8), a busca foi exclusivamente ativa, também com o apoio dos Agentes de Saúde do local (Figura 4.9).



Figura 4.3: Fotos de Mâncio Lima (AC). Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 4.4: Hospital Dr. Abel Pinheiro Maciel Filho, localizado em Mâncio Lima (AC). Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 4.5: Unidade de Saúde da Família Sofia de Almeida Barreto, localizado em Mâncio Lima (AC). Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 4.6: Fotos de Cruzeiro do Sul (AC). Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 4.7: Unidade de Saúde Gilmar Cândido da Silva, localizado em Lagoinha (Cruzeiro do Sul/AC). Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 4.8: Foto de Guajará (AM). Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 4.9: Busca ativa na região de Guajará (AM). Fonte: Arquivo pessoal.

O processamento das amostras foi realizado utilizando a infraestrutura do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre – Campus Floresta (UFAC) (Figura 4.10), em Cruzeiro do Sul (Acre).



Figura 4.10: Universidade Federal do Acre - Campus Floresta. Fonte: Arquivo pessoal.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários:

Critério de inclusão:

Todos os indivíduos residentes nas localidades acima descritas que aceitaram participar de nosso estudo, independente de apresentarem ou não sintomas de malária.

Critério de exclusão:

Foram excluídos de nosso estudo populações indígenas, grupos religiosos, militares, presidiários, doentes mentais, parturientes e gestantes, além de crianças abaixo de 12 anos de idade.

4.3. Comitê de ética

Esse projeto e seu termo de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248) (Anexo I).

4.4. Coleta de dados pessoais e epidemiológicos

As coletas foram realizadas por meio de visitas domiciliares (busca ativa) ou por busca passiva. Durante as visitas, os indivíduos foram informados sobre as formas de transmissão da malária e medidas profiláticas. O projeto foi explicado ao indivíduo, ressaltando que a sua participação era de livre e de espontânea vontade sem prejuízo para seu atendimento ou tratamento. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo leram e foram informados do conteúdo do termo de consentimento. Após consentimento dos indivíduos, foi obtida uma autorização por escrito de todos os voluntários (Anexo II) ou de seus responsáveis, caso menor de idade (Anexo III). Após a assinatura, todos os voluntários participaram de uma entrevista com o objetivo de preencher um questionário de investigação para a coleta de dados pessoais e epidemiológicos (Anexo IV).

4.5. Coleta de sangue

Após a coleta dos dados pessoais e epidemiológicos e da obtenção do consentimento, aproximadamente 20 mL de sangue foram coletados por via endovenosa em tubos Vacutainer com heparina ou com EDTA (Becton & Dickinson). As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas antes do início do tratamento (D0) e após o término do tratamento (D15), em caso de indivíduos com diagnóstico positivo de malária por *P. falciparum*. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 min e os plasmas correspondentes foram aliquotados e estocados a -20°C até o momento do uso. As amostras coletadas em tubos com EDTA foram criopreservadas utilizando o mesmo volume da solução criopreservadora glicerolyte

(0.9% NaCl, 4.2% sorbitol, 20% glicerol, *Sigma*) e, então, estocadas a -70°C até o momento do uso.

No total, foram coletadas 352 amostras: 124 amostras de Cruzeiro do Sul, 88 amostras de Mâncio Lima, e 87 amostras de Guajará. Também foram coletadas 53 amostras de indivíduos que residem nas áreas estudadas sem histórico de malária (controles de área) (Anexo V). Entre as 299 amostras de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará, 20 possuíam o diagnóstico positivo para *P. falciparum* e tiveram o sangue coletado após o tratamento.

4.6. Diagnóstico

4.6.1. Diagnóstico microscópico

Por ocasião da coleta de sangue foram confeccionadas lâminas de distensão sanguínea e gota espessa, coradas pelo *Giemsa (Merck)* para identificação e quantificação de parasitos circulantes por microscopia. A avaliação da parasitemia se baseou na contagem do número de parasitos por 200 leucócitos e o resultado foi expresso em parasitas/ μ L, de acordo com a fórmula:

$\text{parasitas}/\mu\text{L} = \frac{\text{número de parasitas} \times 8\,000}{\text{número de leucócitos}}$

Assumindo uma leucometria média de 8.000 leucócitos/ μ L de sangue para todo paciente com malária foi realizado uma regra de três para obter a parasitemia/ μ L de sangue. Na presença de poucos parasitos (menos de 9 em 200 leucócitos), 300 leucócitos adicionais foram contados, para maior precisão do diagnóstico.

4.6.2. Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular foi realizado nas 352 amostras de CZS, ML e GJ. DNA foi extraído de, aproximadamente, 200µL de sangue utilizando o kit QIAmp(QIAGEN), segundo as indicações do fabricante. Após a extração de DNA, foi realizada a técnica de *Nested PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)* usando *primers* específicos para gênero (rPlu5 e rPlu6) e espécies (rVIV1 e rVIV2 para *P. vivax* e rFAL1 e rFAL2 para *P. falciparum*), como descrito previamente (150). A amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) e Veriti 96 Well Cyclor (Applied Biosystem), nas seguintes condições:

Tabela 4.1: Alternância de temperaturas dos ciclos para a amplificação.

	24 ciclos para 1º reação e 30 ciclos para 2º reação					
Plu5 / Plu6; Viv1 / Viv2; Fal1 / Fal2	95°C -05'	58°C - 02'	72°C - 02'	94°C - 01'	58°C - 02'	72°C - 05'

Ao final da reação, 10µL do produto amplificado foram homogeneizados a 3µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0.25 %, xileno cianol 0.25% e glicerina 30%) para eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, a uma corrente constante de 95 V/cm durante aproximadamente 45 min. Após a eletroforese, os fragmentos foram visualizados utilizando-se o transiluminador High Performance UV transilluminator (UVP) .

4.7. Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos

A proteína vacinal recombinante GMZ2.6C, e seus componentes GLURP-R0, MSP-3 e Pfs48/45-6C foram doados pelo colaborador Dr. Michael Theisen (*Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca*). Foram utilizados a proteína vacinal recombinante GMZ2.6c, que contém a região R0 N-terminal da proteína

GLURP (GLURP-R0), a região C-terminal da proteína MSP-3 (MSP-3Ct) e o fragmento 6C da proteína Pfs48/45 (Pfs48/45-6c) – além dos fragmentos individuais GLURP-R0, MSP-3Ct e Pfs48/45-6c (Figura 4.11).

Para mapeamento epitópico, foram utilizados quatro peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes regiões da MSP-3Ct e 13 peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes regiões da GLURP-R0 descritos previamente como peptídeos imunodominantes (106,151). Foram utilizados também dois peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes regiões da Pfs48/45 (Figura 4.11) selecionados a partir de uma análise de predição de epítomos de célula B utilizando os algoritmos presentes no Immuno Epitope Database (IEDB) para a predição de: 1) polaridade e hidrofobicidade (DNASTAR); 2) exposição na superfície (Surface accessibility scale) e; 3) propensão antigênica de potenciais epítomos lineares presentes nesta proteína (Bepipred).

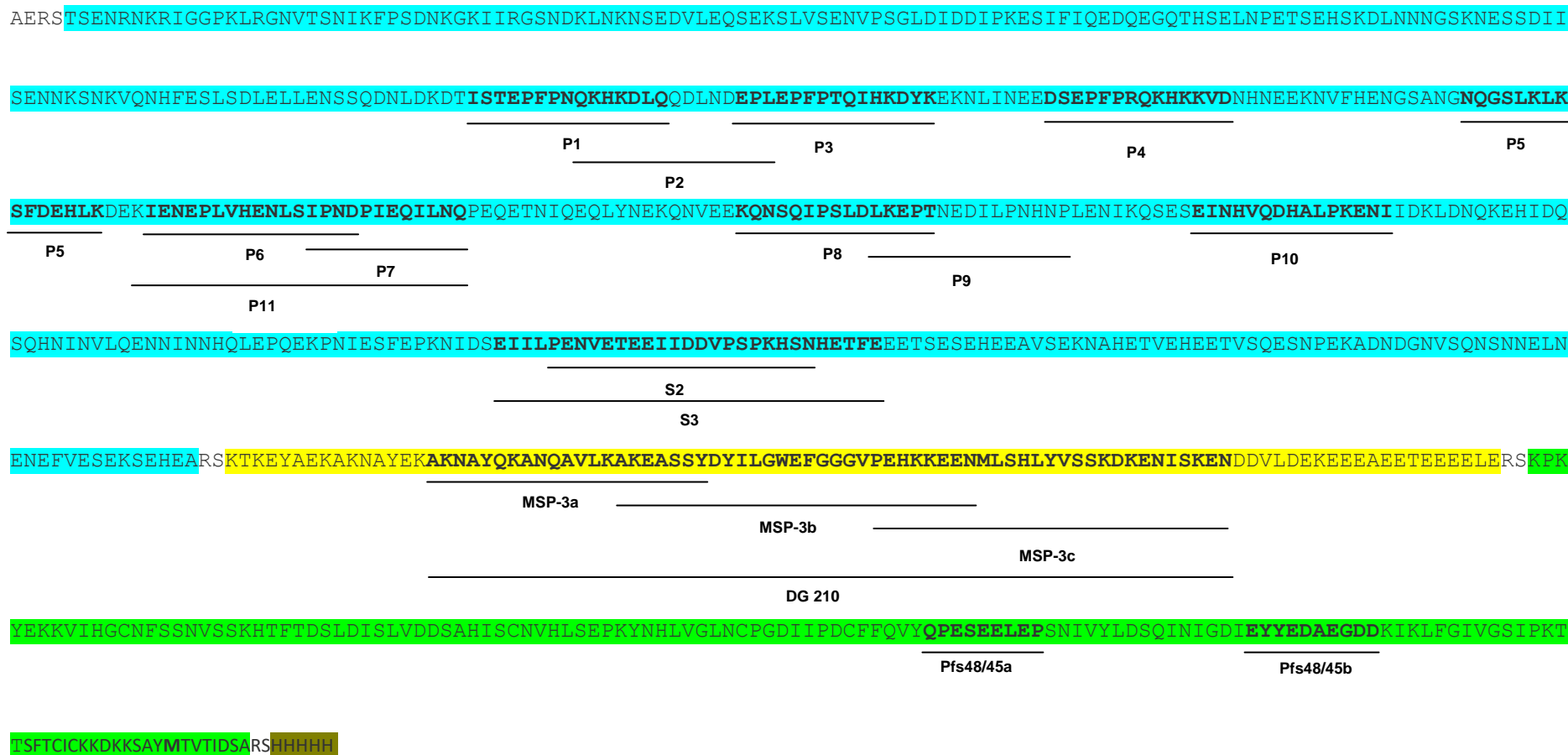


Figura 4.11: Sequência de aminoácidos da proteína recombinante GMZ2.6c, indicando a sequência da GLURP-R0 (azul), da MSP-3 (amarelo), da Pfs48/45 (verde) e a etiqueta de poli-histidina (marrom). As linhas indicam as sequências dos peptídeos usados no mapeamento epitépico. Fonte: Elaborado pela autora.

4.8. Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas recombinantes GMZ2.6c, GLRURP-R0, MSP-3Ct e Pfs48/45-6c e mapeamento epitópico

A pesquisa de anticorpos contra as proteínas recombinantes GMZ2.6c, GLURP-R0, MSP-3Ct e Pfs48/45-6c e contra os peptídeos sintéticos foi realizada pelo ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Placas de 96 poços (*Nunc Maxisorp, Dinamarca*) foram sensibilizadas com cada uma das proteínas recombinantes ou dos peptídeos sintéticos e os ELISAs foram realizados de acordo com os protocolos mostrados na Tabela 4.1. O mapeamento epitópico foi realizado em todas as amostras que apresentaram anticorpos contra a proteína recombinante correspondente. Foi realizada a pesquisa de anticorpos IgG, IgM, IgE e IgA. A pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi realizada em todas as amostras que apresentaram anticorpos IgG para cada uma das proteínas recombinantes. A reação foi revelada com uma solução contendo 0.4 mg/mL de orto-fenilenodiamino (OPD, *Sigma, St. Louis, MO*) em tampão citrato-fosfato pH 5,4 (ácido cítrico 24 mM, *Sigma*, e fosfato de sódio dibásico 51 mM, *Sigma, St. Louis, MO*) e de peróxido de hidrogênio 30% (*Merck*) diluído 1:2000 durante, aproximadamente, 5 min. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2 N (*Merck*).

Após a revelação, a leitura da densidade óptica (DO) foi feita em espectrofotômetro Spectramax (*Molecular Devices, Califórnia, EUA*) a 492 nm. Todos os plasmas foram testados em duplicata e cada placa recebeu um controle "branco" (sem plasma), dois soros-padrão reativos e cinco soros-padrão não reativos, sendo estes últimos, plasmas de indivíduos que não residem em área endêmica e que nunca tiveram malária. O resultado foi analisado pelo limite mínimo de positividade (*cut off*), que foi calculado a partir da média da DO dos controles não reativos mais três vezes o desvio padrão (DP). A positividade foi determinada pela razão (*Ratio*) entre a DO das amostras testadas e o *cut off*. As amostras com resultados superiores a 1.0 foram consideradas positivas.

Tabela 4.2: Protocolos estabelecidos para realização dos ELISAs para as proteínas recombinantes GMZ2.6c, GLURP-R0, MSP-3, Pfs48/45.

Antígeno	Diluição antígeno	Lavagem	Bloqueio	Soro	Anticorpo (*)
GMZ2.6c	1 µg/mL em PBS	4 vezes com PBS-Tween 20 0,1%	3% de leite mólico em PBS + 0,1% Tween 20 por 1 hora em temperatura ambiente	Diluído(1:100) em 1% de leite mólico em PBS + 0,1% Tween 20 por 2 horas em temperatura ambiente	Diluído (1:1000) em 1% de leite mólico em PBS + 0,1% Tween 20 por 1 hora em temperatura ambiente
GLURP-R0	1 µg/mL em Carbonato/Bicarbonato	4 vezes com PBS Tween 20 0,05%	2% de leite mólico em PBS por 2 horas em temperatura ambiente	Diluído (1:100) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora em temperatura ambiente	Diluído (1:1000) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora em temperatura ambiente
MSP-3	5 µg/mL em Carbonato/Bicarbonato	3 vezes com PBS Tween 20 0,05%	5% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora a 37 °C	Diluído (1:100) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora a 37°C	Diluído (1:1000) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora a 37°C
Pfs48/45	1 µg/mL em PBS	4 vezes com PBS	5% de leite mólico em PBS por 1 horas em temperatura ambiente	Diluído(1:100) em 1% de leite mólico em PBS + 0,1% Tween 20 por 4 horas em temperatura ambiente	Diluído (1:1000) em PBS por 1 hora em temperatura ambiente
Peptídeos Sintéticos	5 µg/mL em Carbonato/Bicarbonato	3 vezes com PBS Tween 20 0,05%	5% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora em temperatura ambiente	Diluído (1:100) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora a 37°C	Diluído (1:1000) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora a 37°C

(*) Anti-IgG (Anti-IgG1 – Anti-IgG4), Anti-IgM, Anti-IgA e Anti-IgE humana marcada com peroxidase.

4.9. Análise dos dados epidemiológicos e estatísticos

Os dados epidemiológicos e os resultados dos experimentos foram armazenados no banco de dados Epi-Info 6 (Centers for Disease Control and Prevention) e analisados utilizando os programas Epi-Info e GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc). Os testes estatísticos utilizados para verificar as associações e correlações entre os resultados experimentais e os dados epidemiológicos foram selecionados a partir do tipo e tamanho das amostras de cada variável. Considerou-se que a diferença era significativa quando a probabilidade de erro era igual ou inferior a 5% ($P \leq 0.05$).

4.9.1. Teste de Spearman

Spearman é um método estatístico não-paramétrico de associação entre duas variáveis mensuradas a nível ordinal, onde a correlação é calculada pelo coeficiente de *Spearman* (r_s). Esse foi o método estatístico utilizado na avaliação da correlação entre variáveis estudadas, utilizado em nosso trabalho para verificar as associações entre dados epidemiológicos numéricos, como por exemplo, tempo de residência em área endêmica e dados de resposta imune humoral.

4.9.2. Teste do Qui-quadrado

O teste do qui-quadrado é um método estatístico para n amostras independentes, cujas proporções observadas nas diversas modalidades estão dispostas em tabelas de contingência 2×2 , sendo os valores esperados deduzidos matematicamente, e onde se procura determinar se as proporções observadas nas diferentes categorias são independentes ou estão associadas. Esse foi o teste utilizado para a avaliação das frequências entre as variáveis analisadas como, por exemplo, o número de respondedores e não respondedores em cada um dos grupos estudados.

4.9.3. Teste de Mann Whitney

O teste não-paramétrico de *Mann Whitney* compara as médias de dois grupos não-pareados. Esse foi o teste escolhido para a avaliação estatística das diferenças existentes entre duas variáveis estudadas de indivíduos diferentes, como por exemplo, diferenças entre médias dos níveis de anticorpos (Ratio) entre indivíduos parasitados e não parasitados.

4.9.4. Teste de Wilcoxon

O teste não-paramétrico de *Wilcoxon* compara as médias de dois grupos pareados. Esse foi o teste escolhido para a avaliação estatística das diferenças existentes, por exemplo, nos níveis de anticorpos (Ratio) antes (Dia 0) e 15 dias após o início do tratamento (Dia 15).

A metodologia utilizada no presente trabalho está esquematicamente resumida na Figura 4.12.

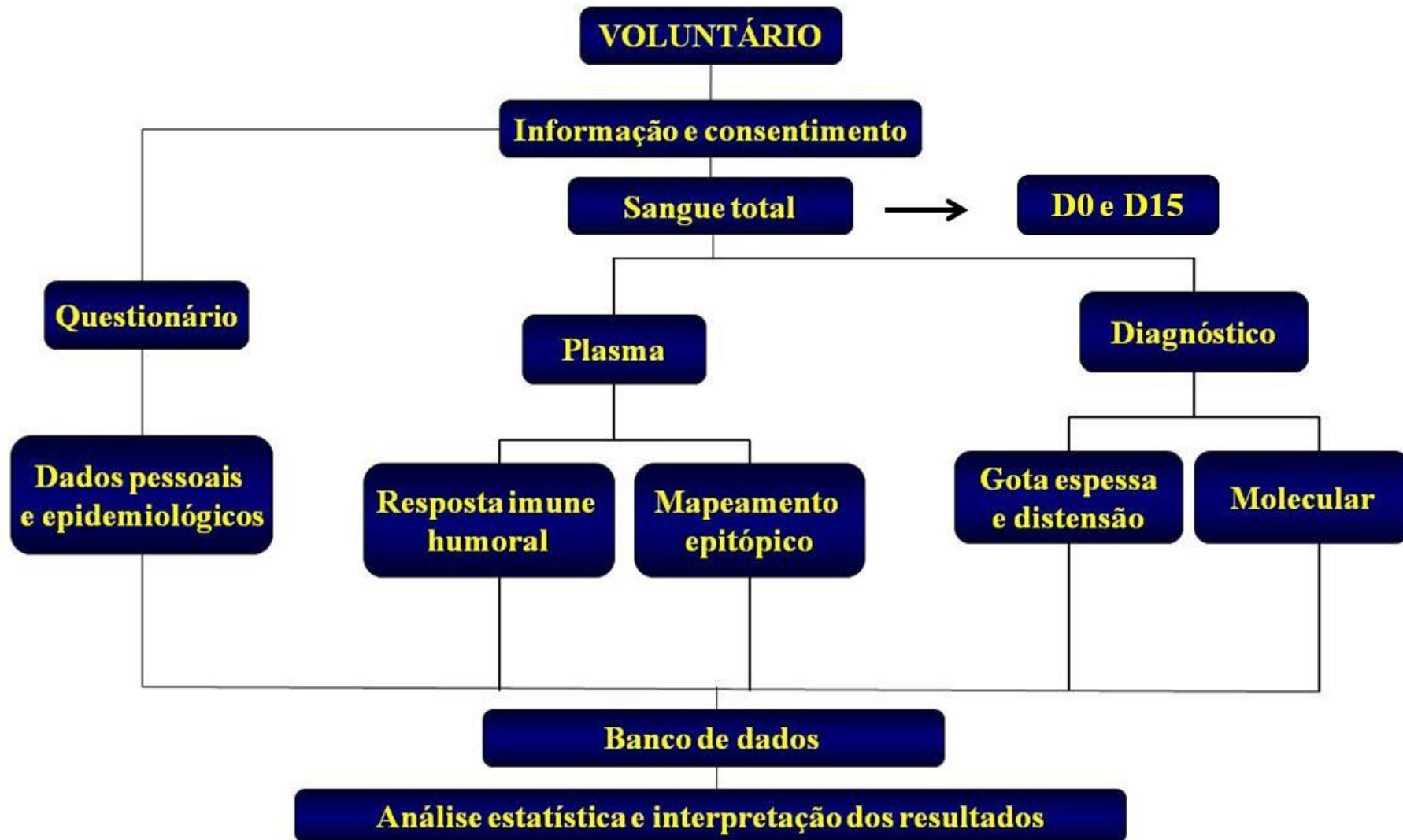


Figura 4.12: Resumo esquemático da metodologia. Fonte: Elaborado pela autora.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos dos participantes do estudo

Para a avaliação do perfil da resposta anticorpo à proteína GMZ2.6c e seus componentes, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45, foram utilizadas amostras de 124 indivíduos residentes em Cruzeiro do Sul (Grupo CZS), de 88 indivíduos residentes em Mâncio Lima (Grupo ML) e de 87 indivíduos residentes em Guajará (Grupo GJ). Também foram utilizadas as amostras de 53 indivíduos residentes em áreas endêmicas sem histórico de malária que foram utilizadas como controles de área (grupo CO).

As principais características dos grupos CZS, ML, GJ e CO estão apresentadas nas Figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 e na Tabela 5.1. Os dados da história pessoal e epidemiológica de todos os pacientes correspondem aos do início do estudo.

O grupo CZS consistia de 58 (46,7%) indivíduos do sexo feminino e 66 (53,3%) do sexo masculino, com idades variando entre 12 e 73 anos (33 ± 15). A grande maioria desses indivíduos (98,2%) era proveniente da região amazônica e estava residindo em área endêmica, em média, há 33 anos (33 ± 15). Os indivíduos do grupo CZS relataram uma média de 10 episódios de malária (10 ± 13), sendo que, dos indivíduos que relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença (99,2%), 67% relataram infecção prévia por *P. falciparum* e *P. vivax*, 23% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax*, 10% apenas por *P. falciparum*. Os indivíduos do grupo CZS relataram o último episódio de malária há 60 meses (60 ± 97), sendo *P. falciparum* a última espécie plasmodial infectante em 35% dos casos, *P. vivax* em 61% dos casos e infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*) em 4% dos casos. No momento da coleta, 72 indivíduos (58%) apresentavam sintomas iniciados, em média 4 dias antes da coleta (4 ± 4), sendo cefaléia, febre e calafrio os mais frequentes, relatados por 74%, 68% e 48% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 64 indivíduos (51,6%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 25 (20,2%) estavam infectados com *P. falciparum* e 39 (31,4%) estavam

infectados com *P. vivax*, com média de parasitemia de 16000 ± 20092 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 19142 ± 17599 para parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax*.

O grupo ML consistia de 44 (50%) indivíduos do sexo feminino e 44 (50%) do sexo masculino, com idades variando entre 13 e 88 anos (35 ± 16). Todos os indivíduos eram provenientes da região amazônica e estavam residindo em área endêmica, em média, há 35 anos (35 ± 16). Os indivíduos do grupo ML relataram uma média de 13 episódios prévios de malária (13 ± 13). Todos os indivíduos relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença, sendo que 19% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax* e 81% relataram infecção prévia por *P. vivax* e por *P. falciparum*. Os indivíduos do grupo ML relataram o último episódio de malária há 28 meses (28 ± 45), sendo *P. falciparum* a última espécie plasmodial infectante em 17% dos casos e *P. vivax* em 83% dos casos. No momento da coleta, 48 indivíduos (55%) apresentavam sintomas iniciados, em média, 6 dias antes da coleta (6 ± 14), sendo cefaléia, febre e calafrio os mais frequentes, relatados por 75%, 92% e 57% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 37 indivíduos (42%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 12 (13,6%) estavam infectados com *P. falciparum* e 25 (28,4%) estavam infectados com *P. vivax*, com média de parasitemia de 5600 ± 3577 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 23294 ± 15507 parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax*.

O grupo GJ consistia de 42 (48,3%) indivíduos do sexo feminino e 45 (51,7%) do sexo masculino, com idades variando entre 13 e 83 anos (37 ± 17). Todos os indivíduos eram provenientes da região amazônica e estavam residindo em área endêmica, em média, há 35 anos (37 ± 17). Os indivíduos do grupo GJ relataram uma média de 9 episódios de malária (9 ± 10), sendo que, dos indivíduos que relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença (93%), 70% relataram infecção prévia por *P. falciparum* e *P. vivax*, 22% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax*, 8% apenas por *P. falciparum*. Os indivíduos do grupo GJ relataram o último episódio de malária há 48 meses (48 ± 73), sendo *P. falciparum* a última espécie plasmodial infectante em 28% dos casos e *P. vivax* em 70% dos casos e infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*) em 2% dos casos. No momento da coleta, 21 indivíduos (24,1%) apresentavam sintomas iniciados, em média, 8 dias antes da

coleta (8 ± 8), sendo cefaléia, febre e artralgia os mais frequentes, relatados por 86%, 62% e 48% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 17 indivíduos (19,5%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 6 (6,7%) estavam infectados com *P. falciparum* e 11 (12,8%) estavam infectados com *P. vivax*, com média de parasitemia de 8000 ± 5656 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 10666 ± 8326 parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax*.

O grupo CO (controle de área) consistia de 37 (69,8%) indivíduos do sexo feminino e 16 (30,2%) do sexo masculino, com idades variando entre 17 e 43 anos (23 ± 7). A grande maioria desses indivíduos (96,2%) era proveniente da região amazônica e estava residindo em área endêmica, em média, há 22 anos (22 ± 8). Todos os indivíduos declararam nunca ter sido infectado e nenhum apresentava sintomatologia ou parasitos circulantes no momento da coleta.

O grupo CO apresentou uma maior frequência de indivíduos do sexo feminino que os grupos CZS ($P = 0.008$), ML ($P = 0.03$) e GJ ($P = 0.02$). Os indivíduos do grupo CO apresentaram uma média de idade e de tempo de residência em área endêmica de malária menor que os grupos CZS, ML e GJ ($P < 0.0001$, para todas as análises). O grupo ML apresentou um maior número de infecções anteriores de malária que os grupos CZS ($P = 0.01$) e GJ ($P = 0.0008$). O grupo GJ apresentou um maior tempo de início de sintomas que os grupos CZS e ML ($P = 0.003$, para ambos).

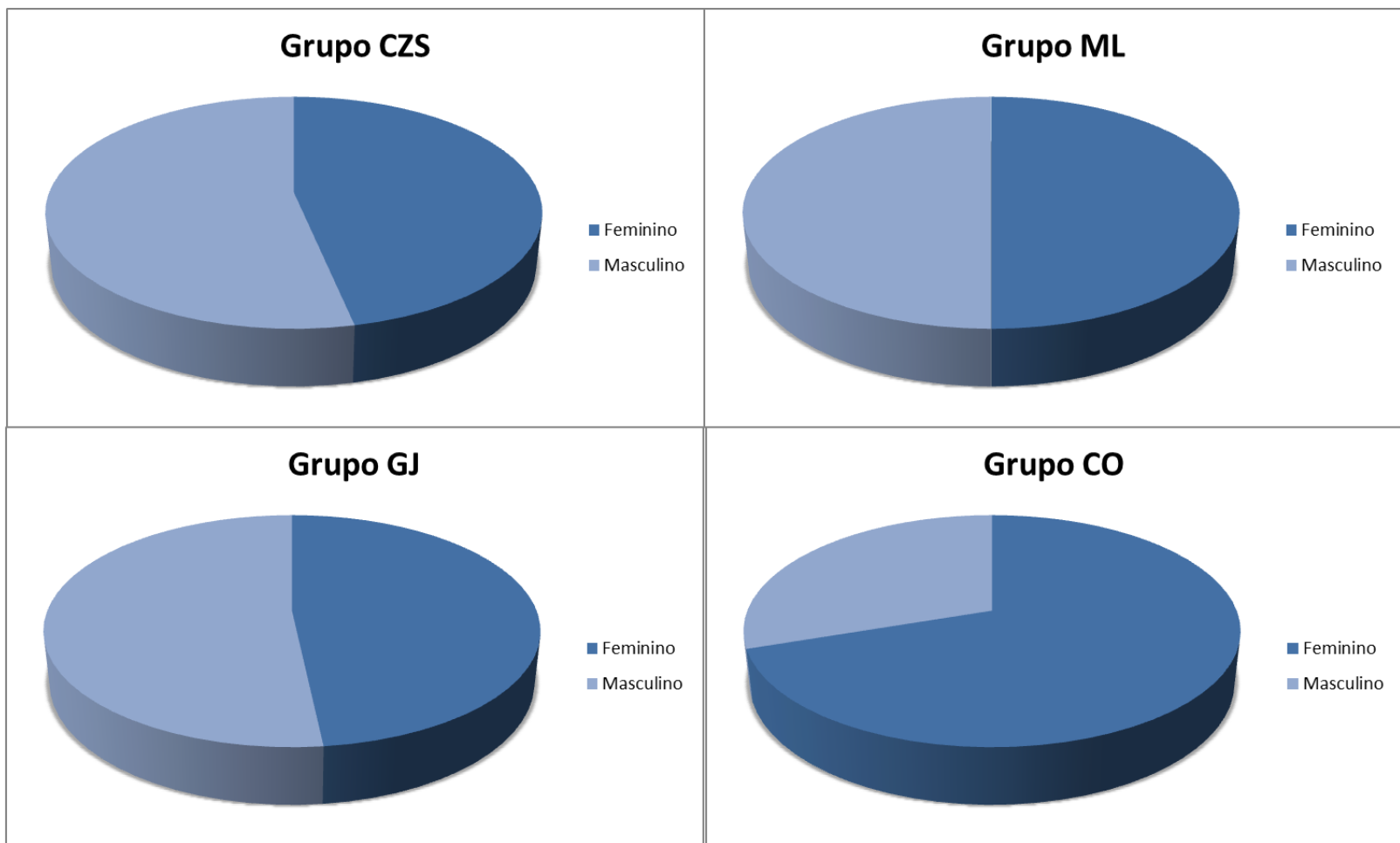


Figura 5.1: Distribuição dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima), GJ (Guajará) e CO (Controle de área) de acordo com o sexo.

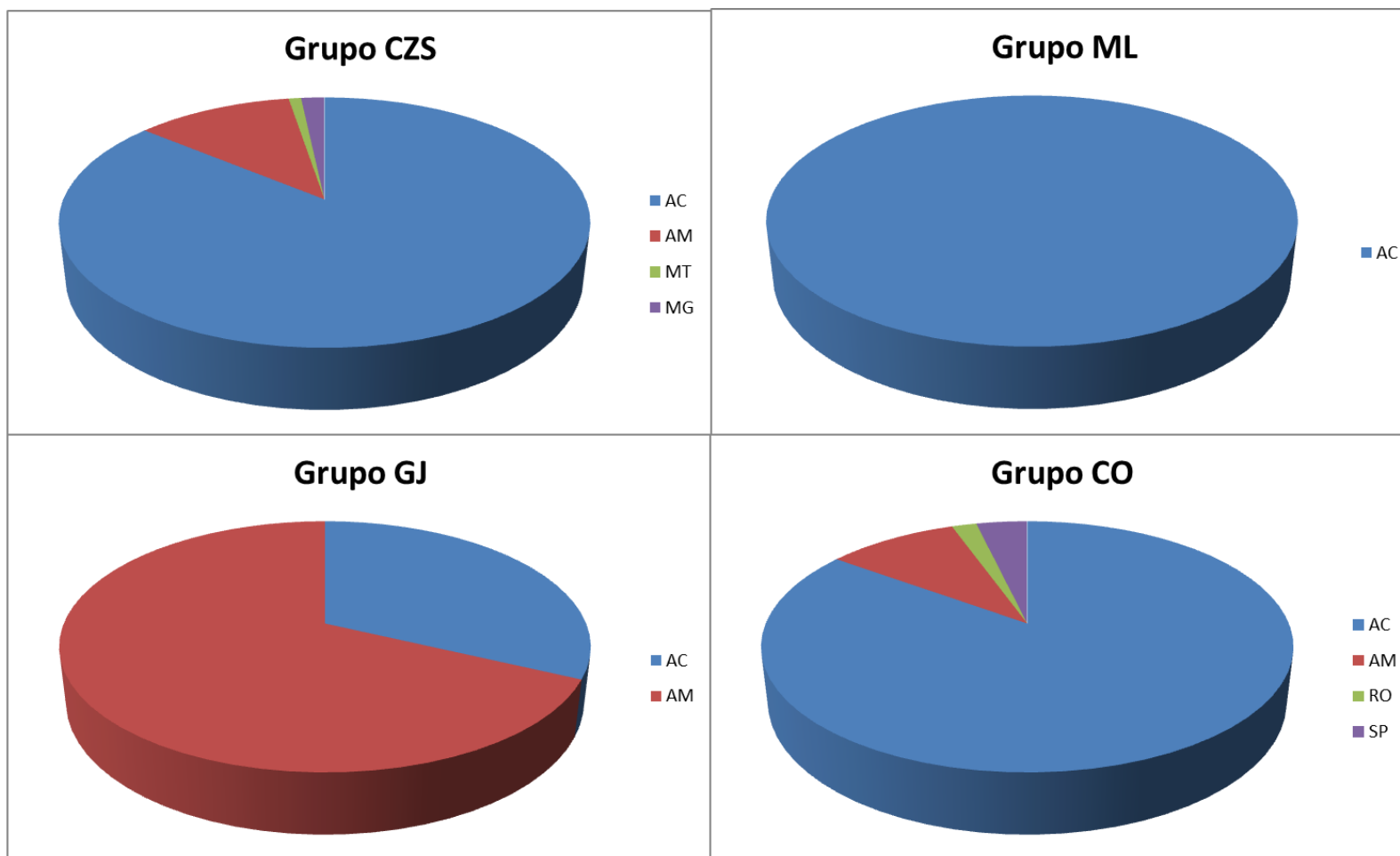


Figura 5.2: Prodecência dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima), GJ (Guajará) e CO (Controle). AC: Acre; AM: Amazonas; MT: Mato Grosso; MG: Minas Gerais; RO: Rondônia; SP: São Paulo.

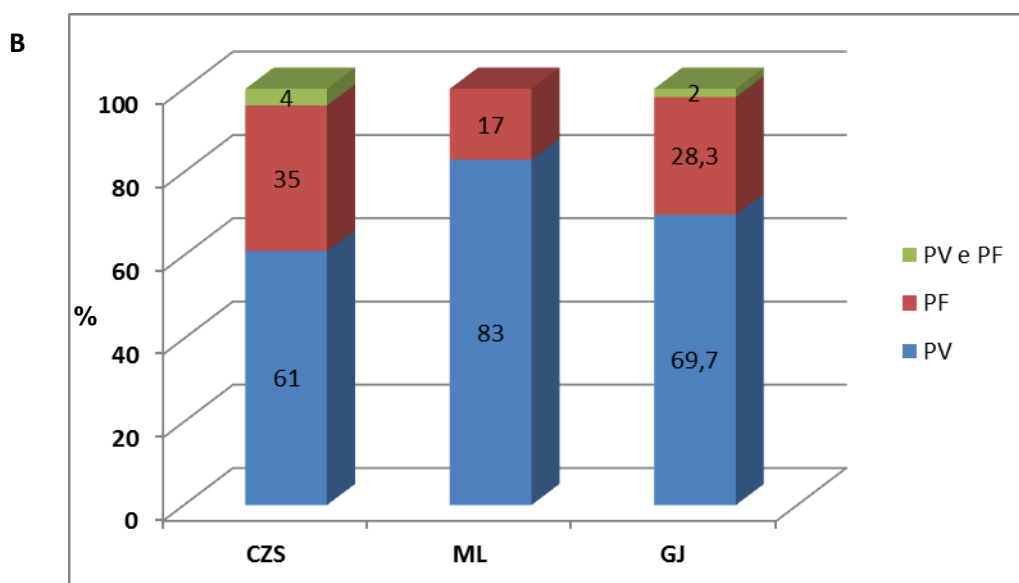
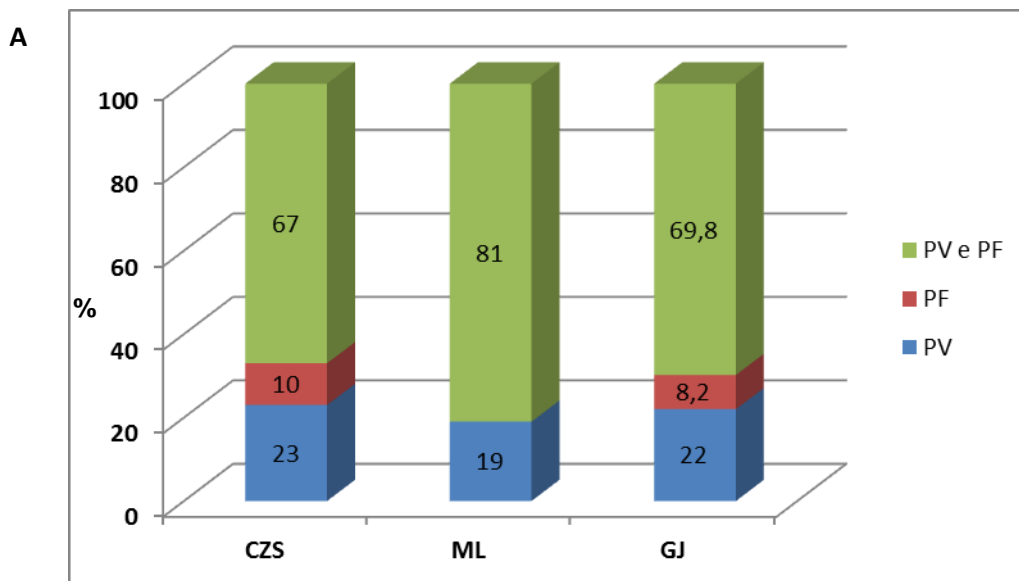


Figura 5.3: Frequência de espécies plasmodiais de episódios prévios de malária (A) e última espécie plasmodial infectante (B). CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; PF: *P. falciparum*; PV: *P. vivax*; PV e PF: *P. vivax* e *P. falciparum* (Infecção mista).

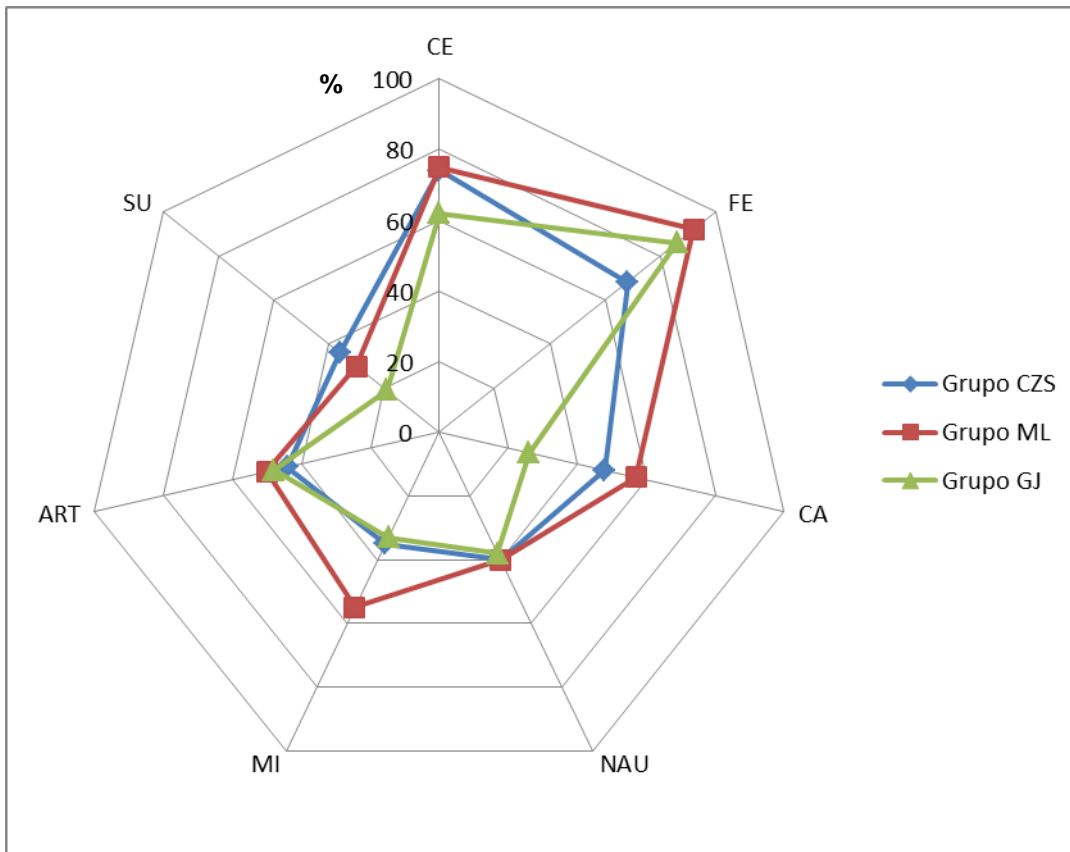


Figura 5.4: Frequência de sintomas relatados pelos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima) e GJ (Guajará), no momento da coleta. CE: Cefaleia; FE: Febre; CA: Calafrio; NAU: Náusea; MI: Mialgia; ART: Artralgia; SU: Sudorese.

Tabela 5.1: Principais características dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima) e GJ (Guajará).

		Cruzeiro do Sul n = 124	Mâncio Lima n = 88	Guajará n = 87
Idade (anos)		33 ± 15	35 ± 16	37 ± 17
Tempo de residência em área endêmica (anos)		33 ± 15	35 ± 16	37 ± 17
Número de infecções anteriores de malária		10 ± 13	13 ± 13*	9 ± 10
Tempo da última infecção (meses)		60 ± 97	28 ± 45	48 ± 73
Tempo de início dos sintomas (dias)		4 ± 4	6 ± 14	8 ± 8 **
Diagnóstico	<i>P. falciparum</i>	25 (20,2%)	12 (13,6%)	6 (6,7%)
	<i>P. vivax</i>	39 (31,4%)	25 (28,4%)	11 (12,8%)
Parasitemia (parasitos/microlitro de sangue)	<i>P. falciparum</i>	16000 ± 20092	5600 ± 3577	8000 ± 5656
	<i>P. vivax</i>	19142 ± 17559	23294 ± 15507	10666 ± 8326

**P = 0.01 ML versus CZS, P = 0.0008 ML versus GJ; *P = 0.003 GJ versus CZS, P = 0.003 GL versus ML. N: Número de indivíduos testados

5.2. Frequência da resposta anticorpo para a GMZ2.6c e seus componentes, MSP-3, GLURP e Pfs48/45

O perfil da resposta imune humoral contra a GMZ2.6c e seus componentes, GLURP, MPSP-3 e Pfs48/45 foi avaliado nos indivíduos dos grupos CZS (n = 124), ML (n = 88), GJ (n = 87) e CO (n = 53).

Os indivíduos que apresentaram anticorpos contra as proteínas estudadas (reativos) foram denominados de respondedores e aqueles que não apresentaram anticorpos contra as proteínas estudadas (não reativos) foram chamados de não respondedores. As principais características dos indivíduos respondedores e não

respondedores para a GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 nos grupos CZS, ML e GJ estão mostradas nas Tabelas 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5.

Verificamos que 83,9 % (104/124) dos indivíduos de CZS, 73,8 % (65/88) dos indivíduos de ML e 72,4 % (63/87) dos indivíduos de GJ apresentavam anticorpos que reconheciam a GMZ2.6c, independente da classe de anticorpo (Figura 5.5).

Não observamos diferença na frequência de indivíduos respondedores quando comparamos os grupos CZS, ML e GJ.

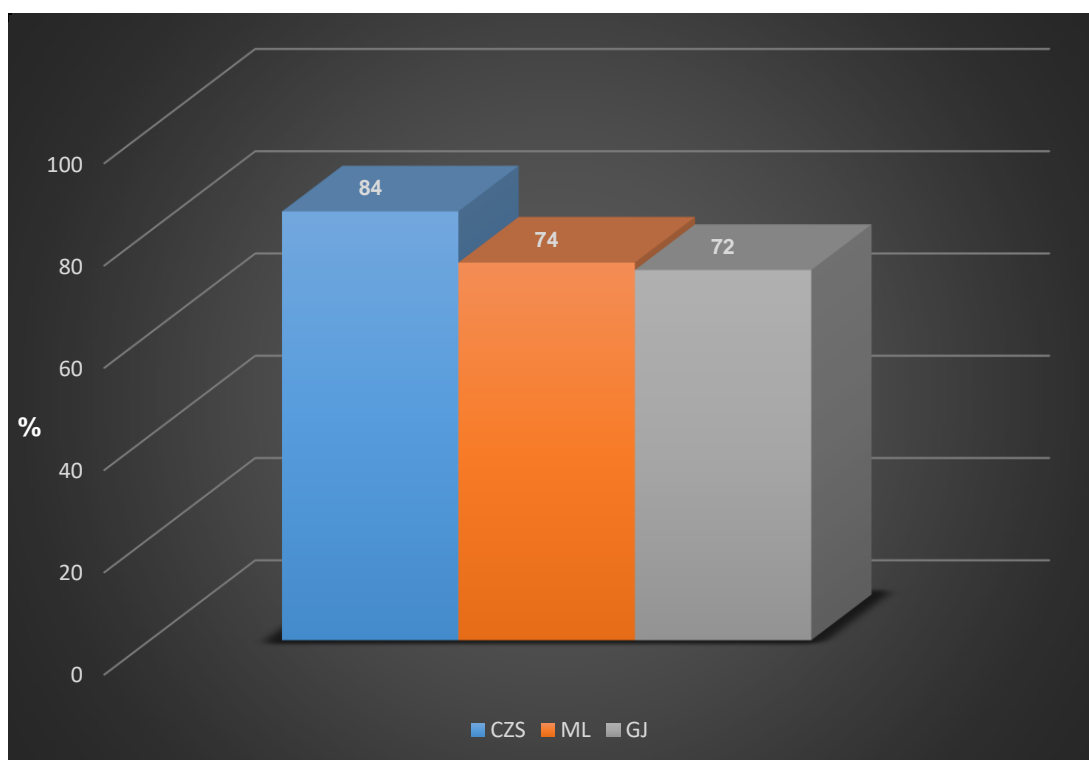


Figura 5.5: Frequência da resposta anticorpo contra a proteína GMZ2.6c nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará.

Quando comparamos os componentes individuais da GMZ2.6c, observamos que a frequência de indivíduos respondedores para GLURP, MSP3 e Pfs48/45 foram, respectivamente, 50,8% (63/124), 38,7% (48/124) e 27,4% (34/124) no grupo CZS, 47,7% (42/88), 27,4% (24/88) e 34% (30/88) no grupo ML e 41,4% (36/87), 12,6% (11/87) e 21,8% (19/87) no grupo GJ (Figura 5.6). Verificamos que a frequência de indivíduos respondedores para MSP-3 foi menor no grupo GJ quando

comparado aos grupos CZS e ML ($P < 0.0001$ GJ *versus* CZS; $P = 0.02$ GJ *versus* ML). Nos grupos CZS e GJ, a frequência de indivíduos com anticorpos contra a GLURP foi maior que a frequência de indivíduos com anticorpos contra a Pfs48/45 ($P = 0.0003$ em CZS; $P = 0.008$ em GJ). Nos grupos ML e GJ, a frequência de indivíduos com anticorpos contra a GLURP foi maior que a frequência de indivíduos com anticorpos contra a MSP-3 ($P = 0.007$ em ML; $P < 0.0001$ em GJ).

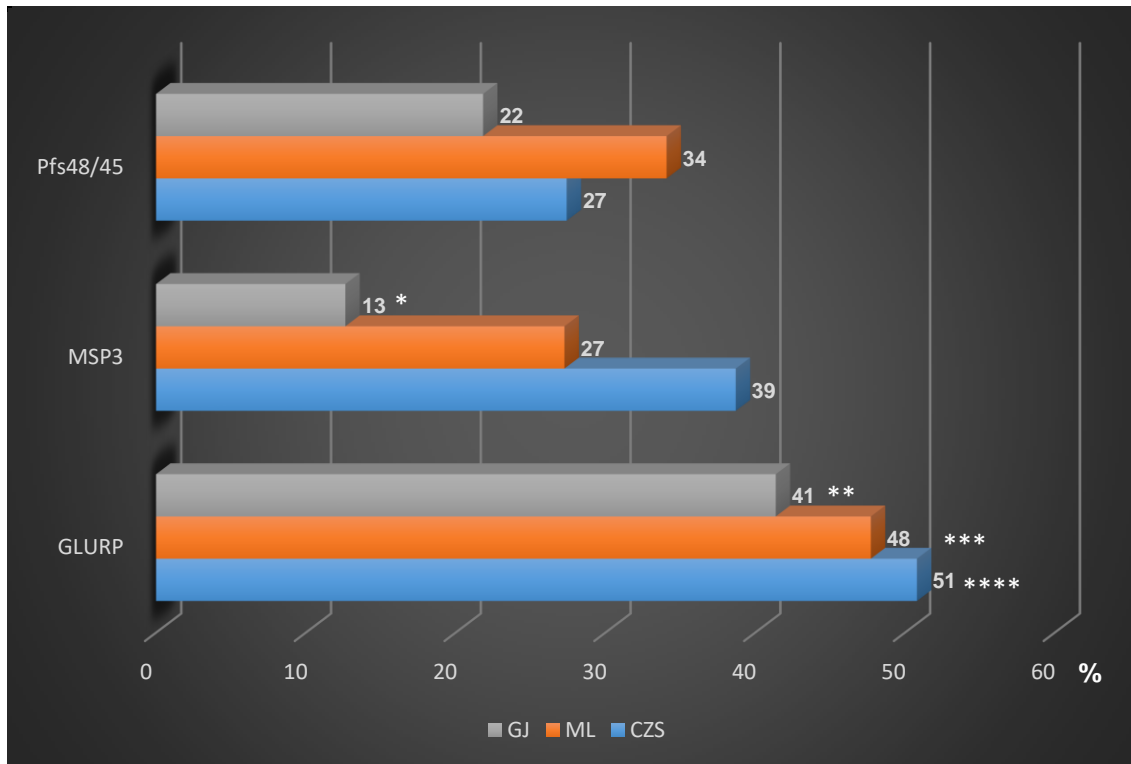


Figura 5.6: Frequência de indivíduos com anticorpos contra a GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; * $P < 0.0001$, GJ *versus* CZS; $P = 0.02$ GJ *versus* ML; ** $P < 0.0001$ GJ GLURP *versus* GJ MSP-3; $P = 0.008$ GJ GLURP *versus* GJ Pfs48/45. *** $P = 0.007$ ML GLURP *versus* ML MSP-3. **** $P = 0.0003$ CZS GLURP *versus* CZS Pfs48/45.

Não observamos nenhuma associação entre a resposta anticorpo contra a GMZ2.6c ou contra a MSP3 e idade, sexo, tempo de residência em área endêmica de malária, presença de sintomas no momento da coleta, espécie infectante, número de infecções anteriores de malária, espécies plasmodiais anteriores, última espécie infectante ou o tempo da última infecção. Entretanto, no grupo ML, observamos que a resposta contra a GLURP estava associada a idade, tempo de residência em área endêmica de malária e ao número de infecções anteriores ($P = 0.03$ para idade; $P =$

0.04 para tempo de residência em área endêmica de malária; $P = 0.03$ para número de infecções anteriores). Também observamos, no grupo CZS, uma associação entre o número de infecções anteriores de malária e a não resposta contra a proteína Pfs48/45 ($P = 0.006$).

Tabela 5.2: Principais características dos indivíduos respondedores e não respondedores para a GMZ2.6c nos grupos CZS, ML e GJ.

	GMZ2.6c					
	CZS		ML		GJ	
	Respondedor (n = 104)	Não respondedor (n = 20)	Respondedor (n = 65)	Não respondedor (n = 23)	Respondedor (n = 63)	Não respondedor (n = 24)
Idade (anos)	33 ± 16	33 ± 13	35 ± 16	36 ± 6	36 ± 16	39 ± 19
Sexo						
Feminino	43	14	31	13	32	10
Masculino	59	6	37	10	31	14
Tempo de residência em área endêmica	33 ± 16	32 ± 12	34 ± 16	35 ± 17	36 ± 16	39 ± 19
Sintomas						
Sim	61	9	35	13	15	6
Não	43	11	30	10	48	18
Espécie infectante						
<i>P. vivax</i>	33	3	13	6	3	-
<i>P. falciparum</i>	16	1	5	-	4	-
Não infectado	55	16	47	17	56	24
Número de infecções anteriores	10 ± 13	10 ± 12	14 ± 14	11 ± 8	9 ± 11	8 ± 9
Espécies anteriores						
<i>P. vivax</i>	19	4	12	4	11	5
<i>P. falciparum</i>	6	4	-	-	5	1
<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	58	13	51	17	39	12
Última espécie infectante						
<i>P. vivax</i>	48	11	50	18	34	12
<i>P. falciparum</i>	29	5	11	3	14	5
<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	4	-	-	-	1	-
Tempo da última infecção (semanas)	54 ± 93	87 ± 112	30 ± 49	21 ± 33	43 ± 61	61 ± 100

CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará. n = número de indivíduos testados.

Tabela 5.3: Principais características dos indivíduos respondedores e não respondedores para a GLURP nos grupos CZS, ML e GJ.

	GLURP					
	CZS		ML		GJ	
	Respondedor (n = 63)	Não respondedor (n = 61)	Respondedor (n = 42)	Não respondedor (n = 46)	Respondedor (n = 36)	Não respondedor (n = 51)
Idade (anos)	35 ± 17	31 ± 13	39 ± 16*	32 ± 15	36 ± 15	38 ± 18
Sexo						
Feminino	23	34	18	25	15	27
Masculino	39	26	23	21	21	24
Tempo de residência em área endêmica	35 ± 17	31 ± 12	38 ± 17**	31 ± 16	36 ± 15	38 ± 18
Sintomas						
Sim	39	31	25	23	11	10
Não	24	30	17	23	25	41
Espécie infectante						
<i>P. vivax</i>	19	17	8	11	1	2
<i>P. falciparum</i>	12	5	5	-	4	-
Não infectado	32	39	29	35	31	49
Número de infecções anteriores	9 ± 9	12 ± 16	16 ± 17***	10 ± 8	11 ± 11	8 ± 10
Espécies anteriores						
<i>P. vivax</i>	14	9	7	9	6	10
<i>P. falciparum</i>	4	6	-	-	2	4
<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	30	37	34	4	24	27
Última espécie infectante						
<i>P. vivax</i>	29	30	33	35	19	27
<i>P. falciparum</i>	15	19	7	7	7	12
<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	1	3	-	-	1	-
Tempo da última infecção (semanas)	69 ± 118	52 ± 72	28 ± 44	28 ± 47	37 ± 47	55 ± 87

CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará. *P = 0.03, respondedor *versus* não respondedor; **P = 0.04, respondedor *versus* não respondedor; ***P = 0.03, respondedor *versus* não respondedor. n = número de indivíduos testados.

Tabela 5.4: Principais características dos indivíduos respondedores e não respondedores para a MSP-3 nos grupos CZS, ML e GJ.

	MSP-3						
	CZS		ML		GJ		
	Respondedor (n = 48)	Não respondedor (n = 76)	Respondedor (n = 24)	Não respondedor (n = 64)	Respondedor (n = 11)	Não respondedor (n = 76)	
Idade (anos)	32 ± 16	34 ± 14	37 ± 17	35 ± 15	42 ± 14	37 ± 17	
Sexo							
	Feminino	22	35	12	32	5	37
	Masculino	25	40	12	32	6	39
Tempo de residência em área endêmica	32 ± 16	34 ± 14	37 ± 18	33 ± 16	41 ± 14	36 ± 17	
Sintomas							
	Sim	24	46	11	37	4	17
	Não	24	30	13	27	7	59
Espécie infectante							
	<i>P. vivax</i>	12	24	2	17	-	3
	<i>P. falciparum</i>	8	9	4	1	2	2
	Não infectado	28	43	18	46	9	71
Número de infecções anteriores	9 ± 9	11 ± 15	16 ± 17	12 ± 11	12 ± 12	9 ± 10	
Espécies anteriores							
	<i>P. vivax</i>	5	18	2	14	1	15
	<i>P. falciparum</i>	4	6	-	-	-	6
	<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	28	39	22	46	8	43
Última espécie infectante							
	<i>P. vivax</i>	19	40	19	49	6	40
	<i>P. falciparum</i>	14	20	5	9	3	16
	<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	2	2	-	-	-	1
Tempo da última infecção (semanas)	67 ± 123	56 ± 77	24 ± 44	30 ± 46	29 ± 41	51 ± 77	

CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará. n = número de indivíduos testados.

Tabela 5.5: Principais características dos indivíduos respondedores e não respondedores para a Pfs48/45 nos grupos CZS, ML e GJ.

	Pfs48/45						
	CZS		ML		GJ		
	Respondedor (n = 34)	Não respondedor (n = 90)	Respondedor (n = 30)	Não respondedor (n = 58)	Respondedor (n = 19)	Não respondedor (n = 68)	
Idade (anos)	31 ± 14	34 ± 16	40 ± 19	33 ± 14	40 ± 19	36 ± 17	
Sexo							
	Feminino	15	42	12	32	9	33
	Masculino	19	46	18	26	10	35
Tempo de residência em área endêmica	31 ± 14	34 ± 15	39 ± 20	32 ± 14	40 ± 19	36 ± 17	
Sintomas							
	Sim	15	55	14	34	5	16
	Não	19	35	16	24	14	52
Espécie infectante							
	<i>P. vivax</i>	6	30	2	17	1	2
	<i>P. falciparum</i>	6	13	4	1	1	3
	Não infectado	24	47	24	40	17	63
Número de infecções anteriores	6 ± 6*	12 ± 15	14 ± 5	13 ± 13	8 ± 9	9 ± 10	
Espécies anteriores							
	<i>P. vivax</i>	7	16	5	11	4	12
	<i>P. falciparum</i>	3	7	-	-	1	5
	<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	14	53	24	44	10	41
Última espécie infectante							
	<i>P. vivax</i>	13	46	22	46	9	37
	<i>P. falciparum</i>	11	23	5	9	6	13
	<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	-	4	-	-	-	1
Tempo da última infecção (semanas)	59 ± 69	60 ± 106	34 ± 54	25 ± 40	39 ± 78	50 ± 72	

CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; *P = 0.006, Respondedor versus não respondedor. n = número de indivíduos testados.

Três dos 53 indivíduos do grupo CO (5,6%) apresentaram anticorpos contra a GMZ2.6c e um indivíduo (1,9%) apresentou anticorpos contra a GLURP. Nenhum dos 53 indivíduos do grupo CO apresentou anticorpos contra a MSP-3 ou contra a Pfs48/45.

5.3. Frequência da resposta anticorpo das classes IgG, IgM, IgA e IgE para a GMZ2.6c e seus componentes, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45

A frequência da resposta anticorpo das classes IgG, IgM, IgA e IgE contra a GMZ2.6c está apresentada na Figura 5.7. No grupo CZS, a frequência de indivíduos com anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra a GMZ2.6c foram, respectivamente, 66,9% (83/124), 62,1% (77/124), 18,5% (23/124) e 8,9% (11/124). No grupo ML, a frequência de indivíduos com anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra a GMZ2.6c foram, respectivamente, 37,5% (33/88), 60,2% (53/88), 11,4% (10/88) e 2,3% (2/88). No grupo GJ, a frequência de indivíduos com anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra a GMZ2.6c foram, respectivamente, 41,4% (36/87), 46% (40/87), 10,3% (9/87) e 2,3% (2/87). Observamos uma maior frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a GMZ2.6c no grupo CZS que nos grupos ML e GJ ($P < 0.0001$, CZS *versus* ML; $P = 0.0003$ CZS *versus* GJ). Também verificamos uma maior frequência de indivíduos com anticorpos IgM contra a GMZ2.6c no grupo CZS que no grupo GJ ($P = 0.02$). Anticorpos anti-GMZ2.6c das classes IgG e IgM foram mais frequentes que anticorpos das classes IgA e IgE nos grupos CZS, ML e GJ ($P < 0.0001$, para todas as análises)

No grupo CZS, os níveis de anticorpos IgG contra a GMZ2.6c foram maiores que os níveis de anticorpos IgM, IgA e IgE ($P = 0.001$, IgG *versus* IgM; $P = 0.0004$ IgG *versus* IgA, $P < 0.0001$ IgG *versus* IgE). Também verificamos que os níveis de anticorpos IgG e IgM contra a GMZ2.6c foram maiores no grupo CZS que no grupo GJ ($P = 0.02$, para IgG; $P = 0.04$, para IgM) (Figura 5.8.).

No grupo ML, verificamos uma correlação entre os níveis de anticorpos IgG contra a GMZ2.6c com idade e tempo de residência em área endêmica de malária ($P = 0.04$; $r = 0.2167$, para idade; $P = 0.04$, $r = 0.2193$, para tempo de residência em área endêmica de malária). Também observamos, nos grupos CZS e ML, uma

correlação entre os níveis de anticorpos IgA com idade e tempo de residência em área endêmica de malária (CZS: $P = 0.0002$; $r = 0.3383$, para idade; $P = 0.0003$, $r = 0.3364$, para tempo de residência em área endêmica de malária. ML: $P = 0.03$; $r = 0.2239$, para idade; $P = 0.04$, $r = 0.2060$, para tempo de residência em área endêmica de malária).

Não observamos associação entre anticorpos IgG, IgM, IgA ou IgE contra GMZ2.6c e sexo, presença de sintomas no momento da coleta, espécie infectante, número de infecções anteriores de malária, espécies plasmodiais anteriores, última espécie infectante, tempo da última infecção ou parasitemia.

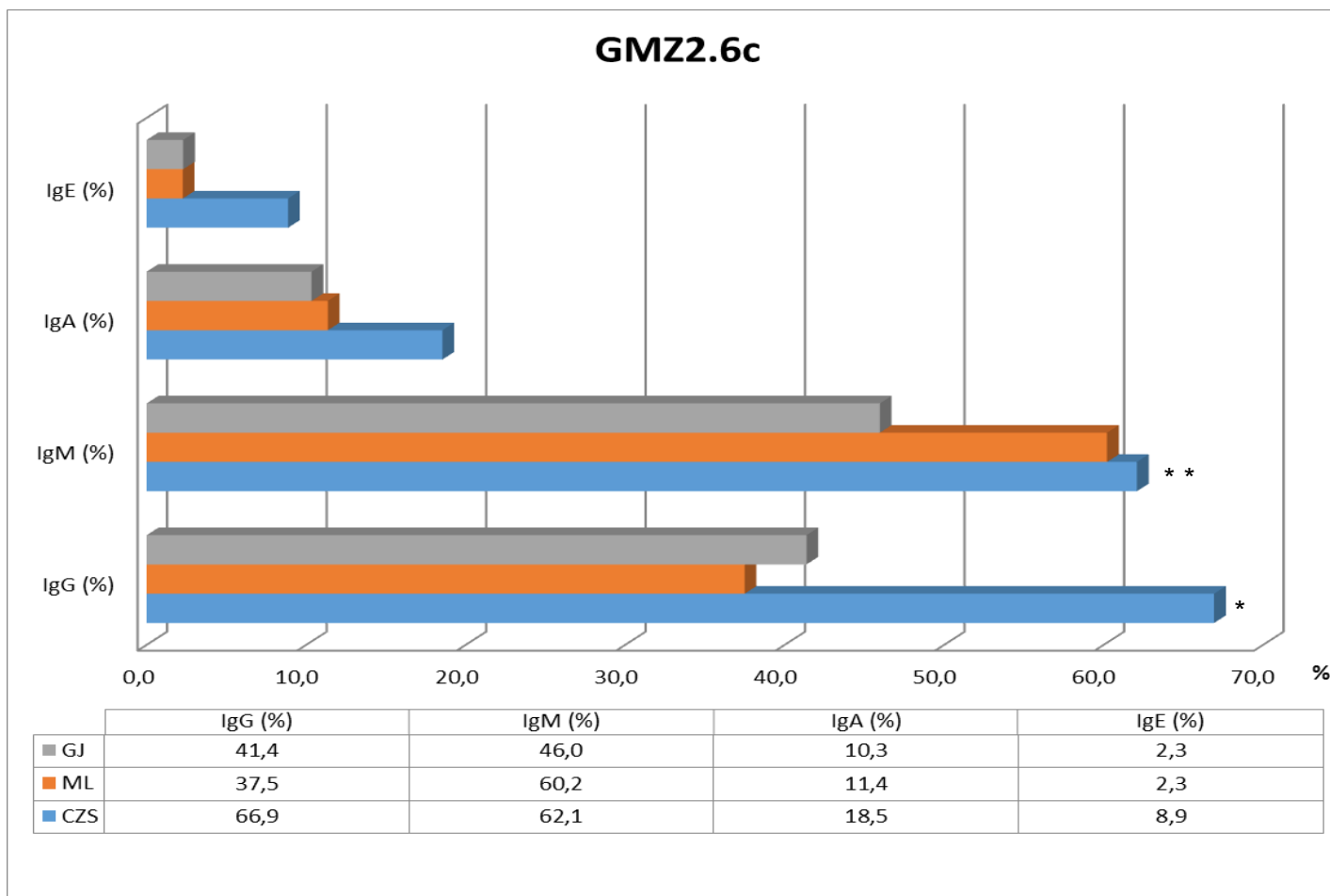


Figura 5.7. Frequência da resposta anticorpo das classes IgG, IgM, IgA e IgE para a GMZ2.6c nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; *P < 0.0001, IgG CZS versus IgG ML; P = 0.0003 IgG CZS versus IgG GJ; **P = 0.02, IgM CZS versus IgM GJ.

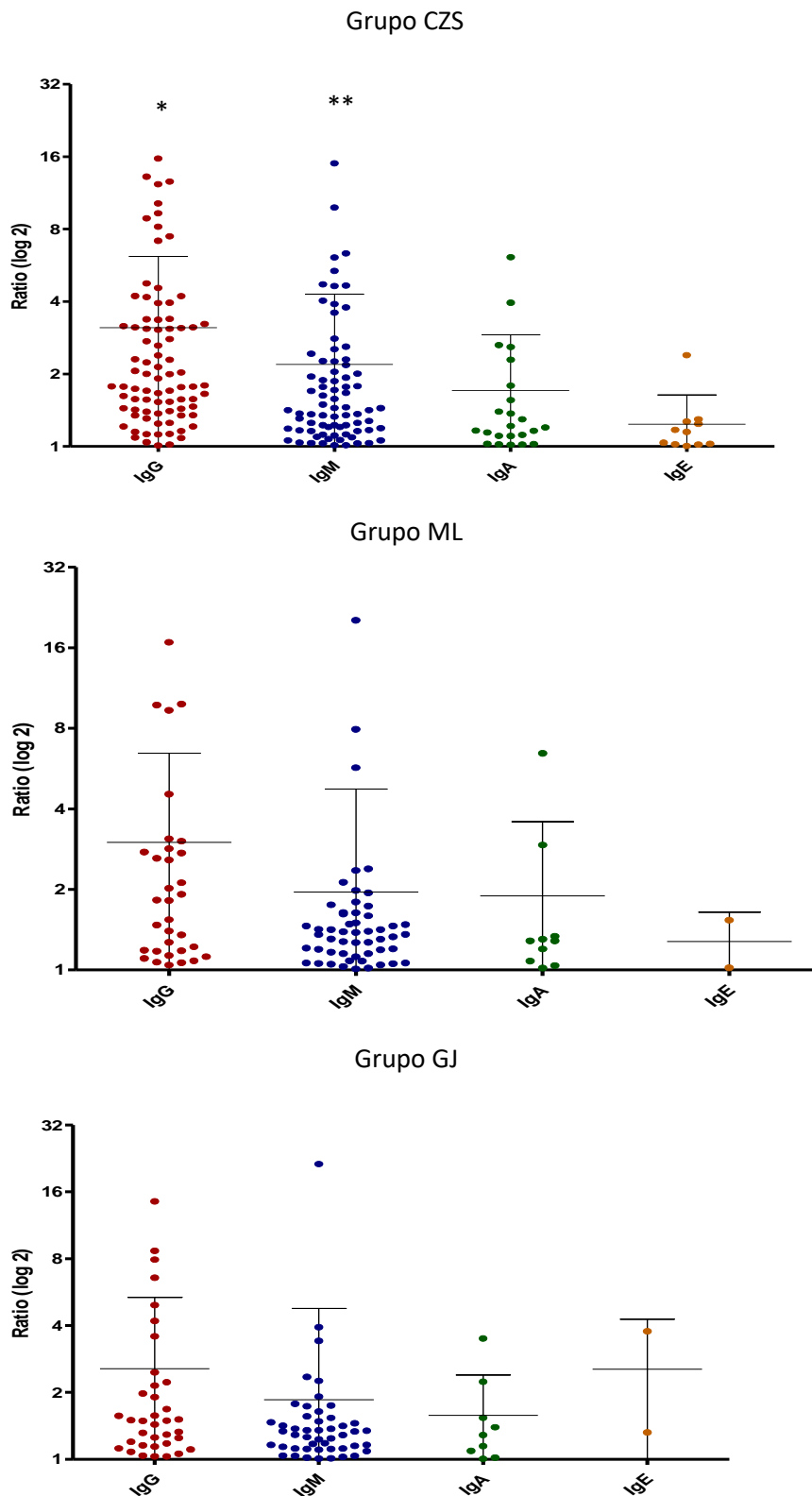


Figura 5.8. Níveis de anticorpos (*Ratio*) IgG, IgM, IgE e IgA contra a GM22.6c nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; * $P = 0.001$, CZS IgG versus CZS IgM; $P = 0.0004$, CZS IgG versus CZS IgA; $P < 0.0001$ CZS IgG versus CZS IgE; $P = 0.02$, CZS IgG versus GJ IgG. ** $P = 0.04$ CZS IgM versus GJ IgM. Linhas representam média e desvio padrão.

Quando comparamos os níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra a GMZ2.6c entre indivíduos parasitados por *P. falciparum* e não parasitados, independente do grupo, verificamos que os níveis de anticorpos IgG e IgM contra a GMZ2.6c foram maiores nos indivíduos parasitados ($P < 0.0001$, para IgG e IgM) (Figura 5.9)

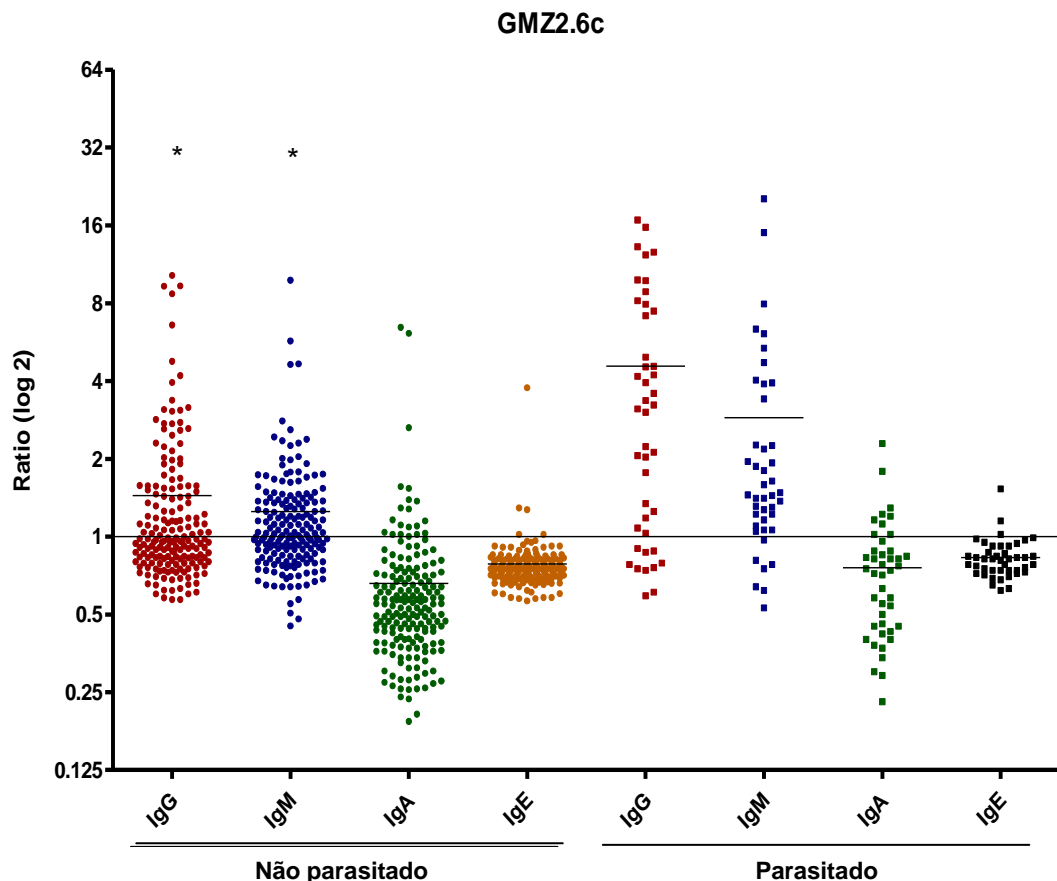


Figura 5.9: Níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra a GMZ2.6c em indivíduos parasitados e não parasitados, independente do grupo. * $P < 0.0001$, não parasitado IgG versus parasitado IgG e não parasitado IgM versus parasitado IgM). Linhas representam média e desvio padrão.

A frequência da resposta anticorpo das classes IgG, IgM, IgA e IgE para a MSP-3, GLURP e Pfs48/45 está mostrada na Figura 5.10. Verificamos que as frequências de indivíduos com anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE para a GLURP foram, respectivamente, 37,1% (46/124), 28,2% (35/124), 11,3% (14/124) e 19,4% (24/124), no grupo CZS, 38,6% (34/88), 23,9% (21/88), 11,4% (10/88) e 6,8% (6/88), no grupo ML e 27,6% (24/87), 20,7% (18/87), 11,5% (10/87) e 4,6% (4/87) no grupo GJ. Para

a MSP-3, as frequências de indivíduos com anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE foram, respectivamente, 25% (31/124), 27,4% (34/124), 17,7% (22/124) e 2,4% (3/124), no grupo CZS, 8% (7/88), 15,9% (14/88), 10,2% (9/88) e 4,5% (4/88), no grupo ML e 5,7% (5/87), 4,6% (4/87), 6,9% (6/87) e 1,1% (1/87) no grupo GJ. Para a Pfs48/45, as frequências de indivíduos com anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE foram, respectivamente, 1,6% (2/124), 11,3% (14/124), 0,8% (1/124) e 19,4% (24/124), no grupo CZS, 2,3% (2/88), 15,9% (14/88), 4,5% (4/88) e 17% (15/88), no grupo ML e 8% (7/87), 5,7% (5/87), 3,4% (3/87) e 8% (7/87) no grupo GJ.

Anticorpos contra a GLURP das classes IgG e IgM foram mais frequentes que anticorpos das classes IgA e IgE ($P < 0.05$). O grupo CZS apresentou uma maior frequência de indivíduos com anticorpos IgE contra a GLURP que os grupos ML e GJ ($P = 0.009$, CZS versus ML; $P = 0.001$, CZS versus GJ). A frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a MSP-3 foi maior no grupo CZS que nos grupos ML e GJ ($P = 0.001$, CZS versus ML; $P = 0.0002$, CZS versus GJ), enquanto que a frequência de indivíduos com anticorpos IgM anti-MSP-3 foi menor no grupo GJ que nos grupos CZS e ML ($P < 0.0001$ GJ versus CZS; $P = 0.02$ GJ versus ML). Indivíduos com anticorpos IgE anti-MSP-3 foram menos frequentes que indivíduos com anticorpos IgG, IgM e IgA anti MSP-3 ($P < 0.0001$, para todas as análises). Indivíduos com anticorpos IgG contra a Pfs48/45 foram mais frequentes no grupo GJ que no grupo CZS ($P = 0.03$) enquanto que indivíduos com anticorpos IgE anti-Pfs48/45 foram mais frequentes em CZS que em GJ ($P = 0.02$). Nos grupos CZS e ML, observamos uma maior frequência de indivíduos com anticorpos das classes IgM e IgE contra a Pfs48/45 que indivíduos com anticorpos IgG e IgA anti-Pfs48/45 ($P < 0.05$, para todas as análises).

Nos grupos ML e GJ, a frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a GLURP foi maior que a frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a MSP-3 ($P < 0.0001$, no grupo ML; $P = 0.0003$, no grupo GJ). Nos grupos CZS, ML e GJ, a frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a GLURP foi maior que a frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a Pfs48/45 ($P < 0.0001$, para todas as análises).

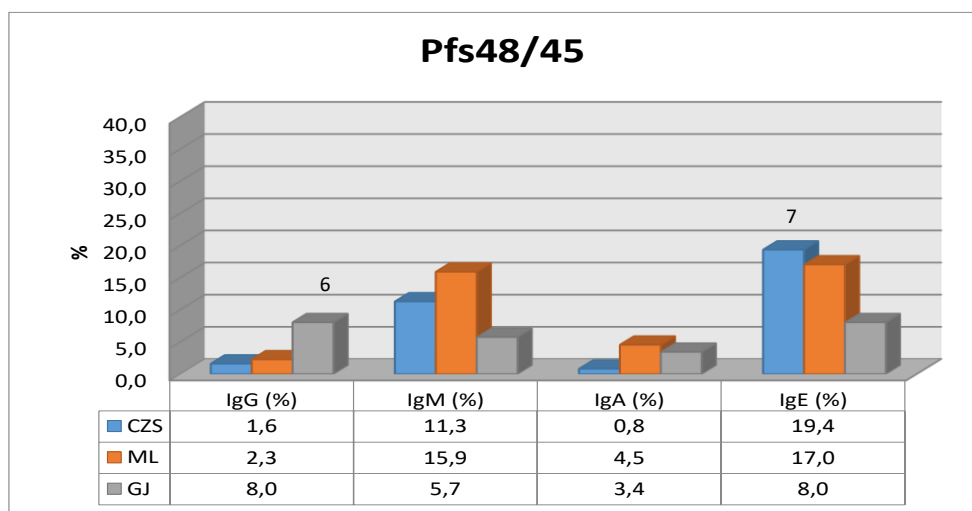
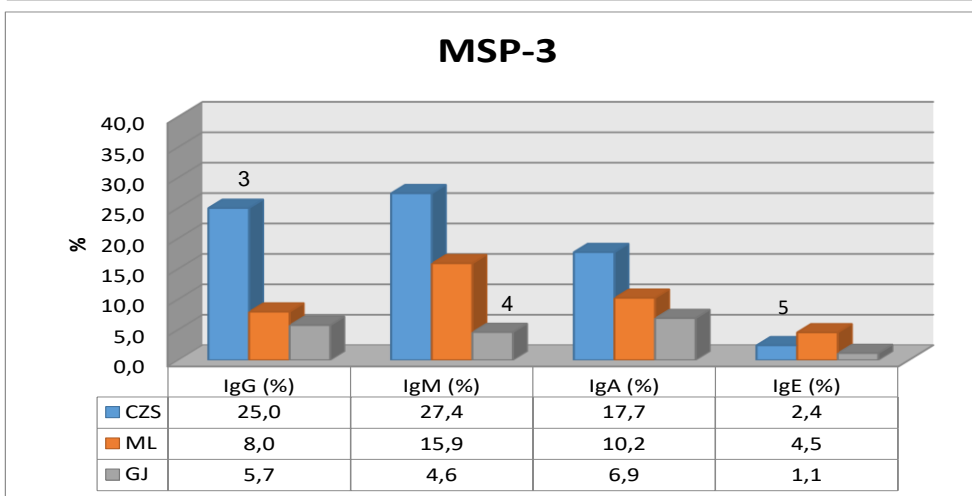
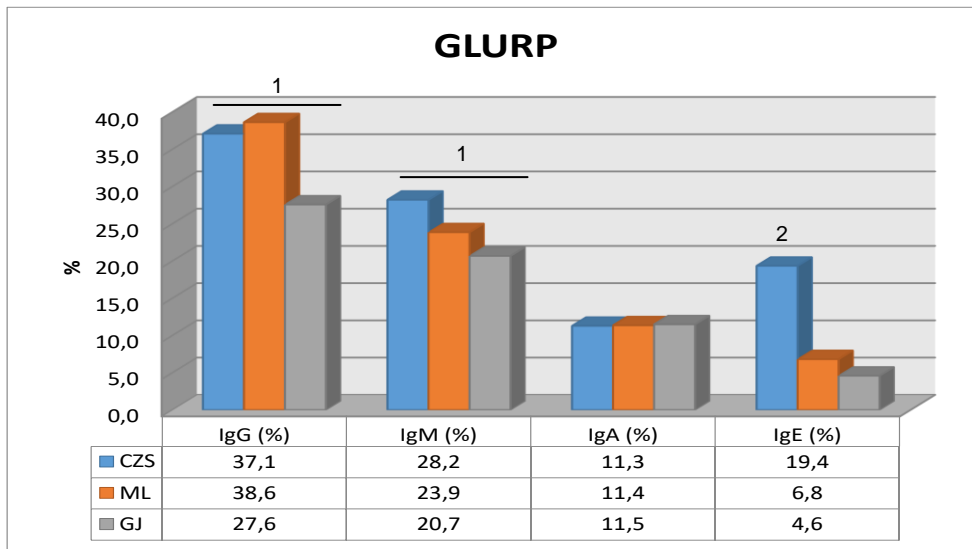


Figura 5.10: Frequência de indivíduos com anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; ¹P < 0.05 IgG e IgM CZS versus IgA e IgE CZS; IgG e IgM ML versus IgA e IgE CZS; IgG e IgM GJ versus IgA e IgE GJ. ²P = 0.009 CZS versus ML; P = 0.001 CZS versus GJ. ³P = 0.001, CZS versus ML; P = 0.0002, CZS versus GJ. ⁴P < 0.0001 GJ versus CZS; P = 0.02 GJ versus ML. ⁵P < 0.0001, IgE anti-MSP-3 versus IgG, IgM e IgA anti MSP-3. ⁶P = 0.03GJ versus CZS. ⁷P = 0.02, CZS versus GJ.

No grupo CZS, observamos maiores níveis de anticorpos IgG contra a GLURP que os níveis de anticorpos IgG contra a MSP-3 ($P = 0.0008$) e maiores níveis de anticorpos IgM contra a GLURP que os níveis de anticorpos IgM contra a Pfs48/45 ($P = 0.004$) (Figura 5.11). Níveis de anticorpos IgG anti-GLURP foram maiores no grupo CZS que no grupo ML ($P = 0.007$).

Nos grupos ML e GJ, os níveis de anticorpos IgG contra a GLURP estavam diretamente correlacionados com idade, tempo de residência e número de infecções anteriores de malária (ML: $P = 0.09$, $r = 0.2742$, IgG *versus* idade; $P = 0.01$, $r = 0.2622$, IgG *versus* tempo de residência em área endêmica de malária; $P = 0.01$, $r = 0.2573$, IgG *versus* número de infecções anteriores de malária. GJ: $P = 0.04$, $r = 0.2332$, IgG *versus* idade; $P = 0.04$, $r = 0.2422$, IgG *versus* tempo de residência em área endêmica de malária; $P = 0.0001$, $r = 0.2600$, IgG *versus* número de infecções anteriores de malária). Também observamos, no grupo GJ, uma correlação positiva entre anticorpos IgA anti-GLURP e idade e tempo de residência em área endêmica de malária ($P = 0.01$, $r = 0.2685$, para ambas análises) e, no grupo CZS, entre anticorpos IgE anti-GLURP e idade e tempo de residência em área endêmica de malária ($P = 0.03$, $r = 0.2020$, para ambas análises). Anticorpos IgA anti- MSP-3 também estavam correlacionados com idade e tempo de residência em área endêmica de malária no grupo GJ ($P = 0.006$, $r = 0.2882$, para ambas análises). No grupo GJ, os níveis de anticorpos IgG anti-Pfs48/45 estavam diretamente correlacionados com idade e tempo de residência em áreas endêmica de malária ($P = 0.01$; $r = 0.2536$, para ambas análises), entretanto, os níveis de anticorpos IgM anti-Pfs48/45 estavam inversamente correlacionados com idade, tempo de residência em área endêmica de malária e número de infecções anteriores ($P = 0.04$; $r = -0,2195$, para idade e tempo de residência em área endêmica de malária; $P = 0.01$, $r = -0.2977$, para número de infecções anteriores de malária).

Não observamos associação entre anticorpos IgG, IgM, IgA ou IgE contra GLURP, MSP-3 ou Pfs48/45 e sexo, presença de sintomas no momento da coleta, espécie infectante, espécies plasmodiais anteriores, última espécie infectante, tempo da última infecção ou parasitemia.

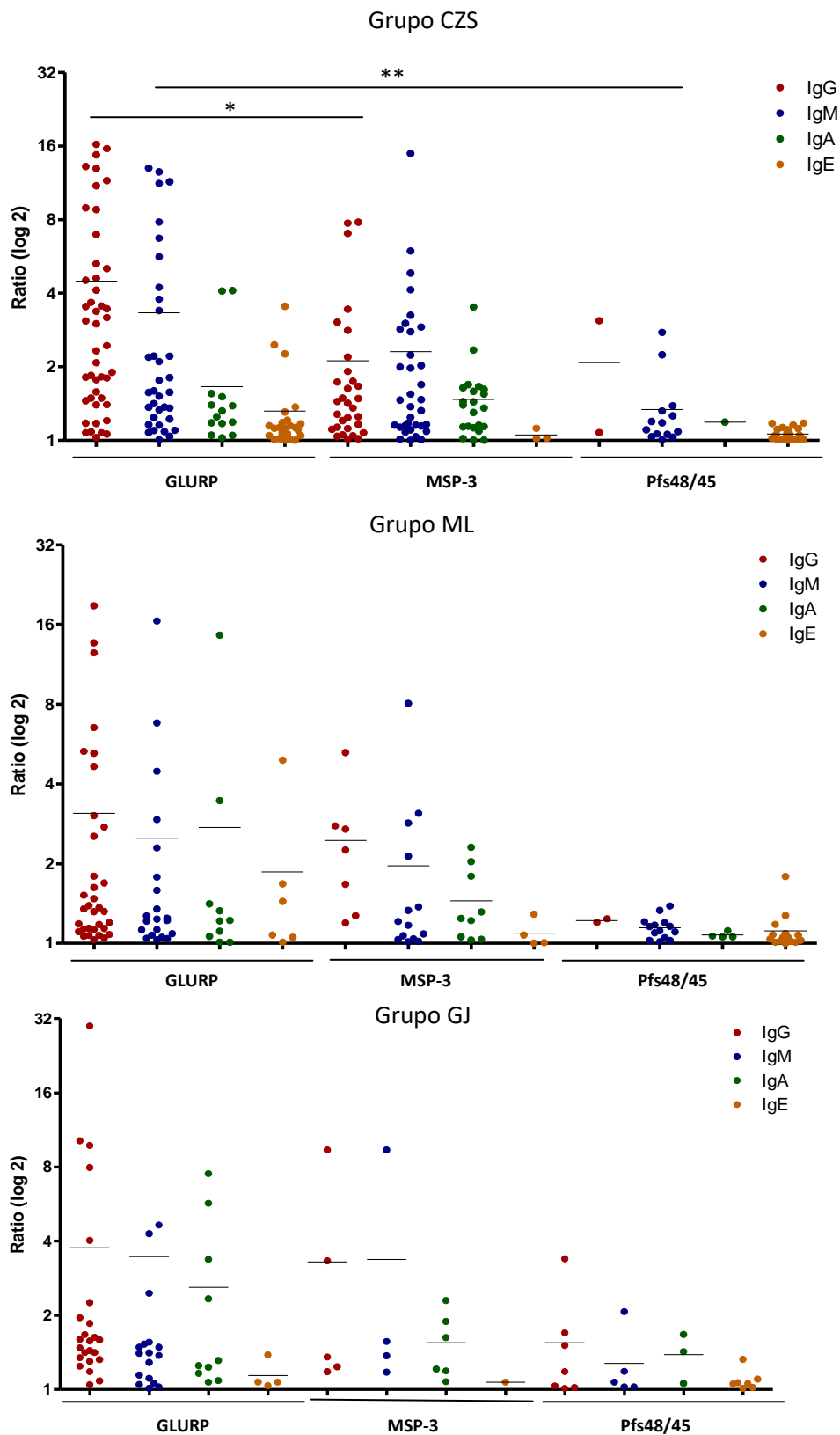


Figura 5.11: Níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra as proteínas GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; *P = 0.0008; **P = 0.004. Linhas representam média.

Quando comparamos os níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra a GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 entre indivíduos parasitados por *P. falciparum* e não parasitados, independente do grupo, verificamos que os níveis de anticorpos IgG e IgM contra a GLURP e contra a MSP-3 foram maiores nos indivíduos parasitados (GLURP: $P < 0.0001$, para IgG e IgM; MSP-3, $P = 0.0007$ para IgG; $P = 0.0006$, para IgM) (Figura 5.12).

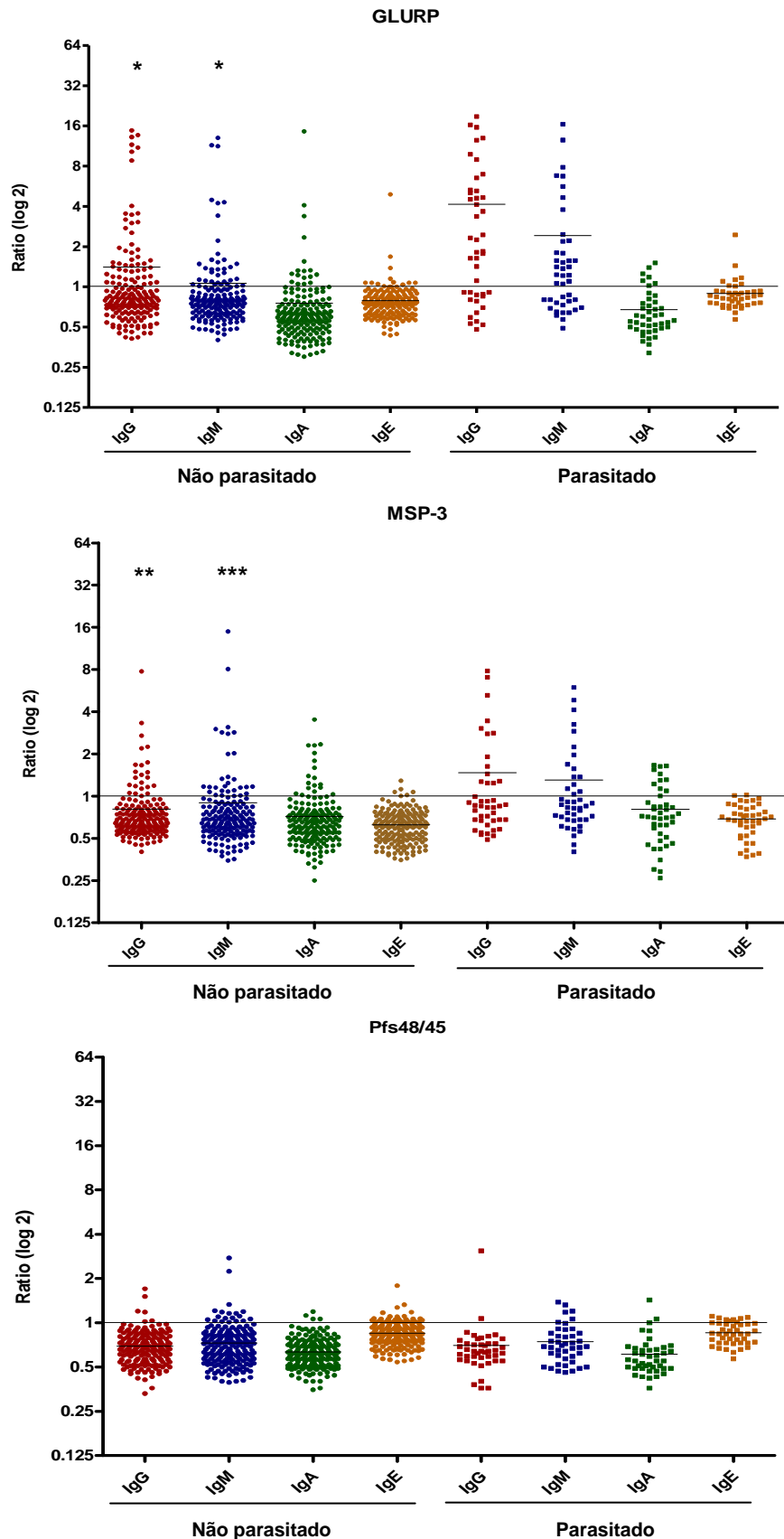


Figura 5.12: Níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra a GLURP, MSP-3 e Pf248/45 em indivíduos parasitados e não parasitados, independente do grupo. * $P < 0.0001$, não parasitado IgG versus parasitado IgG e não parasitado IgM versus parasitado IgM; ** $P = 0.0007$, não parasitado IgG versus parasitado IgG; $P = 0.0006$, não parasitado IgM versus parasitado IgM. Linhas representam média

5.4. Frequência de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c e seus componentes, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45.

A pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi realizada em todas as amostras que apresentaram anticorpos da classe IgG. As frequências de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c estão apresentadas na Figura 5.13. As frequências de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c foram, respectivamente, 73,5% (61/83), 8,4% (7/83), 85,5% (71/83) e 18,1% (15/83), no grupo CZS, 60,6% (20/33), 18,2% (6/33), 72,7% (24/33) e 12,1% (4/33), no grupo ML e 47,2% (17/36), 0% (0/36), 77,8% (28/36) e 22,2% (8/36) no grupo GJ. A frequência de indivíduos com anticorpos IgG1 e IgG3 anti-GMZ2.6c foi maior que a frequência de indivíduos com anticorpos IgG2 e IgG4, nos três grupos estudados ($P < 0.0001$, para todas as análises). Indivíduos com anticorpos IgG1 anti-GMZ2.6c foram mais frequentes no grupo CZS que no grupo GJ ($P = 0.006$).

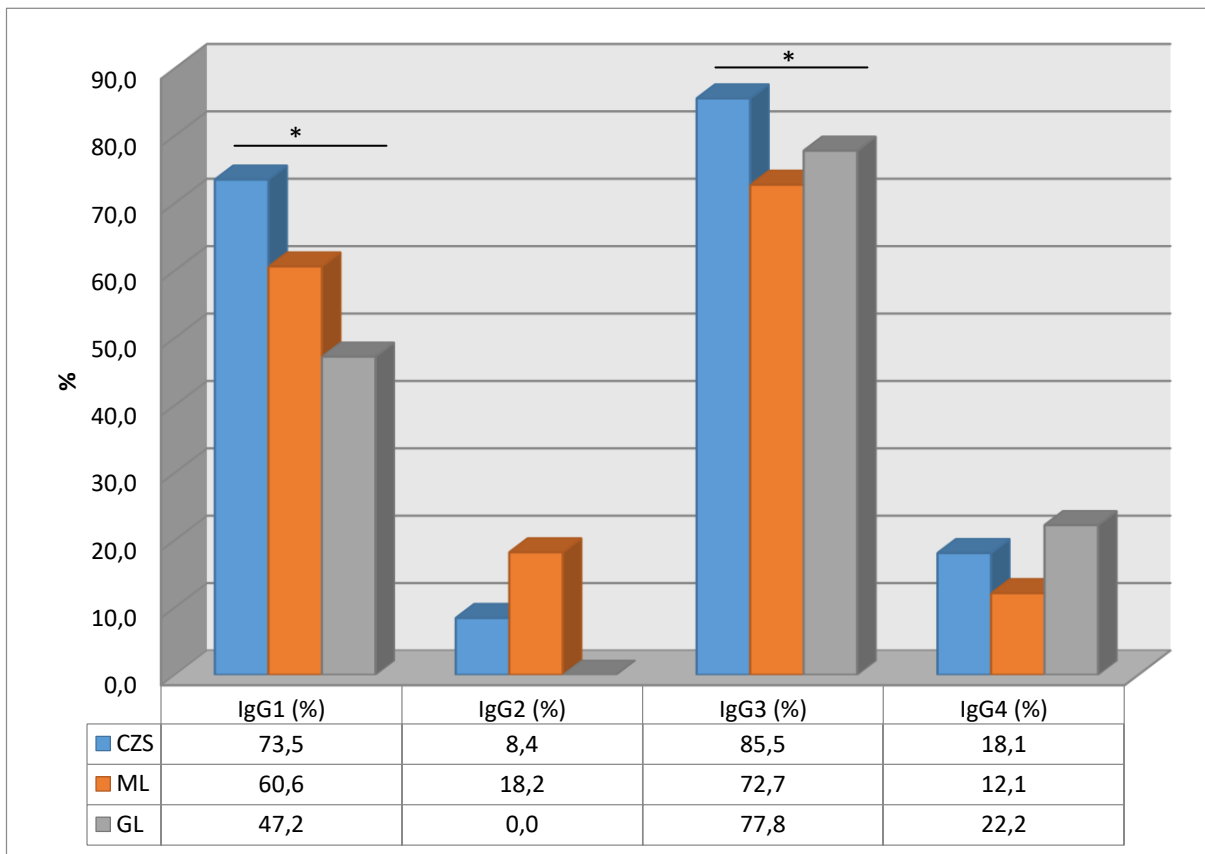


Figura 5.13: Frequência de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c, nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; *P < 0.0001, IgG1 e IgG3 CZS versus IgG2 e IgG4 CZS; IgG1 e IgG3 ML versus IgG2 e IgG4 ML; IgG1 e IgG3 GJ versus IgG2 e IgG4 GJ.

No grupo CZS, os níveis de anticorpos IgG1 contra a GMZ2.6c foram maiores que os níveis de anticorpos IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c (P = 0.002 versus IgG2; P = 0.0002, IgG1 versus IgG3; P < 0.0001, IgG1 versus IgG4) (Figura 5.14.)

Os níveis de anticorpos IgG1 contra a GMZ2.6c estavam positivamente correlacionados com o tempo da última infecção, no grupo CZS (P = 0.004; r = 0.3623) e com o número de infecções anteriores de malária, no grupo GJ (P = 0.002, r = 0.4952). Já os níveis de anticorpos IgG3 anti-GMZ2.6c estavam positivamente correlacionados com idade e tempo de residência em área endêmica de malária, no grupo ML (P = 0.02, r = 0.388, para IgG3 versus idade; P = 0.03, r = 0.3616, para IgG3 versus tempo de residência em área endêmica de malária).

Não observamos associação entre anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 contra a GMZ2.6c e sexo, presença de sintomas no momento da coleta, espécie infectante, espécies plasmodiais anteriores, última espécie infectante, tempo da última infecção ou parasitemia.

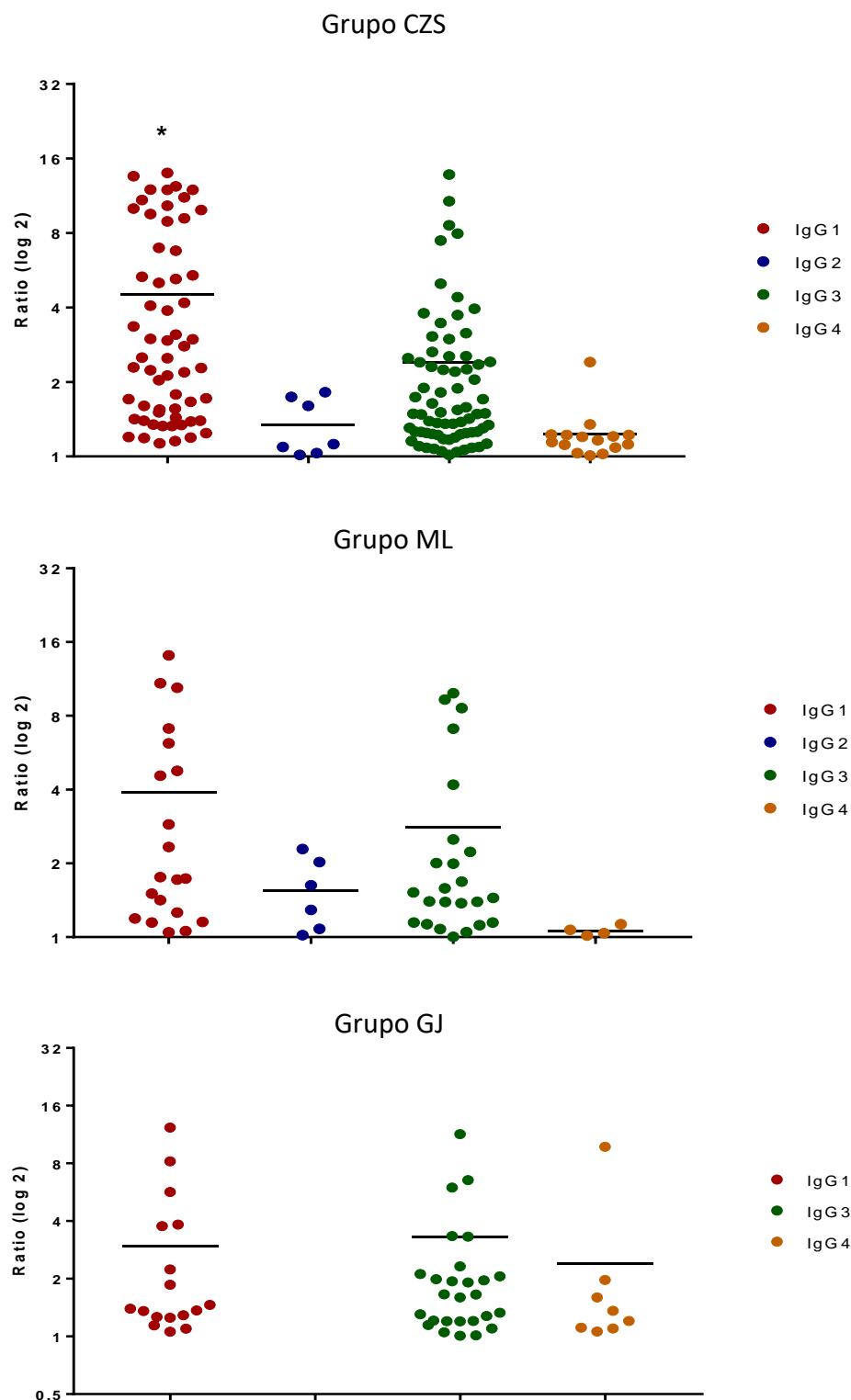


Figura 5.14: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GM22.6c nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; *P = 0.002 IgG1 versus IgG2; P = 0.0002, IgG1 versus IgG3; P < 0.0001, IgG1 versus IgG4. Linhas representam média.

Quando comparamos os níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c entre indivíduos parasitados por *P. falciparum* e não parasitados, independente do grupo, verificamos que os níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 contra a GMZ2.6c foram maiores nos indivíduos parasitados ($P < 0.0001$, para IgG1; $P = 0.001$, para IgG3) (Figura 5.15).

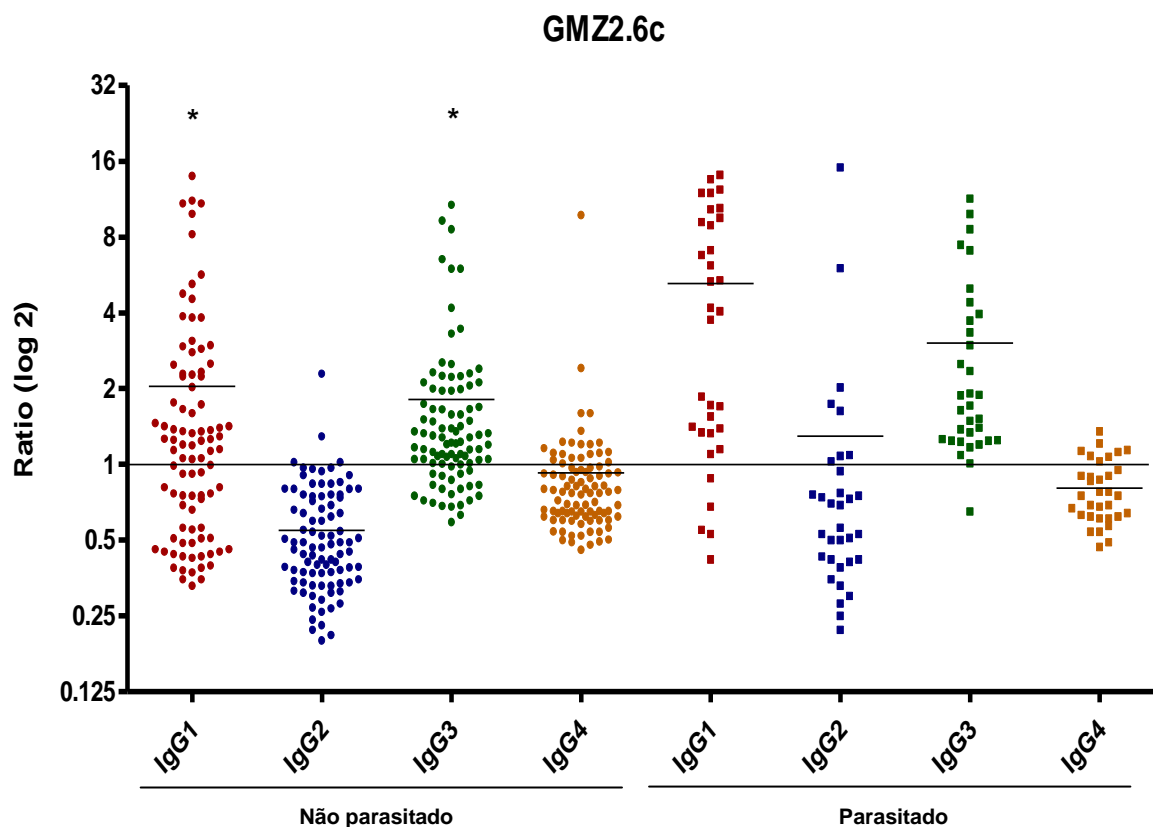


Figura 5.15: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c em indivíduos parasitados e não parasitados, independente do grupo. * $P < 0.0001$, não parasitado IgG1 versus parasitado IgG1; $P = 0.0013$, não parasitado IgG3 versus parasitado IgG3). Linhas representam média.

As frequências de indivíduos com anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 estão mostradas na Tabela 5.6. Para GLURP, as frequências de indivíduos com anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram, respectivamente 87% (40/46), 21,7% (10/46), 71% (33/46) e 21,7% (10/46), no grupo CZS, 88,2% (30/34), 20,6% (7/34), 35,5% (12/34) e 17,6% (6/34) no grupo ML

e 95,8% (23/24), 4,2% (1/24), 37,5% (9/24) e 8,3% (2/24) no grupo GJ. Para MSP-3, as frequências de indivíduos com anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram, respectivamente 90,3% (28/31), 0% (0/31), 25,8% (8/31) e 0% (0/31), no grupo CZS, 85,7% (6/7), 0% (0/7), 42,9% (3/7) e 0% (0/7) no grupo ML e 100% (5/5), 20% (1/5), 80% (4/5) e 40% (4/5) no grupo GJ. Para a Pfs48/45, as frequências de indivíduos com anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram, respectivamente 100% (2/2), 0% (0/2), 0% (0/2) e 50% (1/2), no grupo CZS, 100% (2/2), 0% (0/2), 0% (0/2) e 0% (0/2) no grupo ML e 42,9% (3/7), 14,3% (1/7), 42,9% (3/7) e 57,1% (4/3) no grupo GJ.

Nos grupos CZS e GJ, a frequência de indivíduos com anticorpos IgG1 e IgG3 contra a GLURP foi maior que a frequência de indivíduos com anticorpos IgG2 e IgG4 com a mesma especificidade ($P < 0.0001$, para todas as análises). Também no grupo CZS, observamos uma maior frequência de indivíduos com anticorpos IgG1 contra a MSP-3 que indivíduos com anticorpos IgG2, IgG3 e IgG4 com a mesma especificidade e uma maior frequência de indivíduos com anticorpos IgG3 anti-MSP-3 que indivíduos com anticorpos IgG2 e IgG4 anti-MSP-3 ($P < 0.0001$ IgG1 *versus* IgG2, IgG3 e IgG4; $P =$ IgG2 *versus* IgG3; $P < 0.0001$ IgG3 *versus* IgG4). No grupo ML, indivíduos com anticorpos IgG1 contra a MSP-3 foram mais frequentes que indivíduos com anticorpos IgG2 e IgG4 anti-MSP-3 ($P = 0.004$, para ambas análises). No grupo CZS, verificamos uma maior frequência de indivíduos com anticorpos IgG3 contra a GLURP que indivíduos com anticorpos IgG3 contra a MSP-3 ($P = 0.0001$).

Tabela 5.6. Frequência de indivíduos com anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GLURP, MSP-3 e Pfs48/45, nos grupos CZS, ML e GJ

Grupos	GLURP			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
CZS	40/46* (87%)	10/46 (21,7%)	33/46* (71,7%)	10/46 (21,7%)
ML	30/34 (88,2%)	7/34 (20,6%)	12/34 (35,3%)	6/34 (17,6%)
GJ	23/24** (95,8%)	1/24 (4,2%)	9/24** (37,5%)	2/24 (8,3%)
Grupos	MSP-3			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
CZS	28/31*** (90,3%)	0/31 (0%)	8/31*** (25,8%)	0/31 (0%)
ML	6/7 (-)	0/7 (-)	3/7 (-)	0/7 (-)
GJ	5/5 (-)	1/5 (-)	4/5 (-)	2/5 (-)
Grupos	Pfs48/45			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
CZS	2/2 (-)	0/2 (-)	0/2 (-)	1/2 (-)
ML	2/2 (-)	0/2 (-)	0/2 (-)	0/2 (-)
GJ	3/7 (-)	1/7 (-)	3/7 (-)	4/7 (-)

CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; *P < 0.0001, CZS IgG1 e CZS IgG3 versus CZS IgG2 e CZS IgG4. **P < 0.0001, GJ IgG1 e GJ IgG3 versus GJ IgG2 e GJ IgG4. ***P < 0.0001, CZS IgG1 versus CZS IgG2, CZS IgG3 e CZS IgG4. ****P = 0.0004, CZS IgG3 versus CZS IgG2, P < 0.0001, CZS IgG3 versus CZS IgG4.

Os níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GLURP, a MSP-3 e a Pfs48/45 estão mostradas nas Figuras 5.16, 5.17 e 5.18. Nos grupos CZS, ML e GJ, observamos maiores níveis de anticorpos anti-GLURP da classe IgG1 que os de classe IgG2, IgG3 e IgG4 (CZS: P < 0.0001 IgG1 versus IgG2 e IgG4; P = 0.02, IgG1 versus IgG3. ML: P < 0.0001 IgG1 versus IgG2, IgG3 e IgG4. GJ: P < 0.0001, IgG1 versus IgG2, IgG3 e IgG4). Apenas no grupo CZS, observamos que os níveis de anticorpos IgG3 anti-GLURP foram maiores que os níveis de anticorpos IgG2 e IgG4 anti-GLURP (P < 0.0001, para ambas análises). Também observamos no grupo CZS maiores níveis de anticorpos IgG1 contra a MSP-3 que os níveis de anticorpos IgG2, IgG3 e IgG4 (CZS: P < 0.0001, para todas análises). Não observamos diferenças

quando comparamos os níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 entre os grupos CZS, ML e GJ, para cada um dos componentes da GMZ2.6c.

Os níveis de anticorpos IgG1 contra a GLURP estavam positivamente correlacionados com o tempo da última infecção, no grupo CZS ($P = 0.04$; $r = 0.3585$) e com idade, tempo de residência em área endêmica de malária e o número de infecções anteriores de malária, no grupo GJ ($P = 0.01$, $r = 0.4856$, para IgG1 *versus* idade, $P = 0.01$, $r = 0.4846$ para IgG1 *versus* tempo de residência em área endêmica de malária; $P = 0.01$, $r = 0.4760$, para IgG1 *versus* número de infecções anteriores de malária). Já os níveis de anticorpos IgG3 anti-GLURP estava diretamente correlacionados com idade e tempo de residência em área endêmica de malária, no grupo CZS ($P = 0.04$, $r = 0.3340$, para IgG3 *versus* idade; $P = 0.03$, $r = 0.3104$, para IgG3 *versus* tempo de residência em área endêmica de malária).

Não observamos associação entre anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 e sexo, presença de sintomas no momento da coleta, espécie infectante, espécies plasmodiais anteriores, última espécie infectante, tempo da última infecção ou parasitemia.

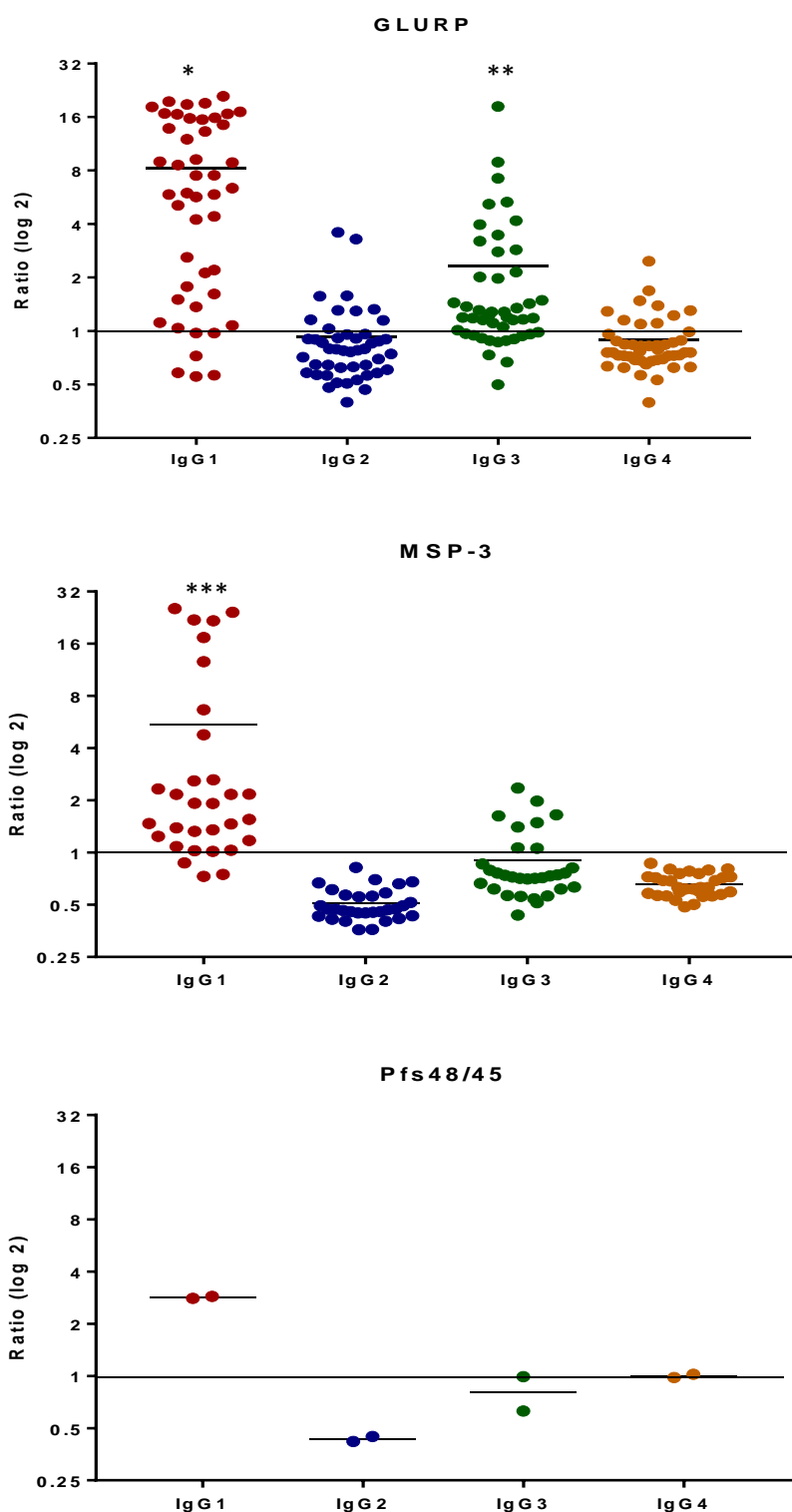


Figura 5.16. Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 no grupo CZS (Cruzeiro do Sul). * $P < 0.0001$ IgG1 versus IgG2 e IgG4; $P = 0.02$, IgG1 versus IgG3. ** $P < 0.0001$ IgG3 versus IgG2 e IgG4. *** $P < 0.0001$ IgG1 versus IgG2, IgG3 e IgG4. Linhas representam média.

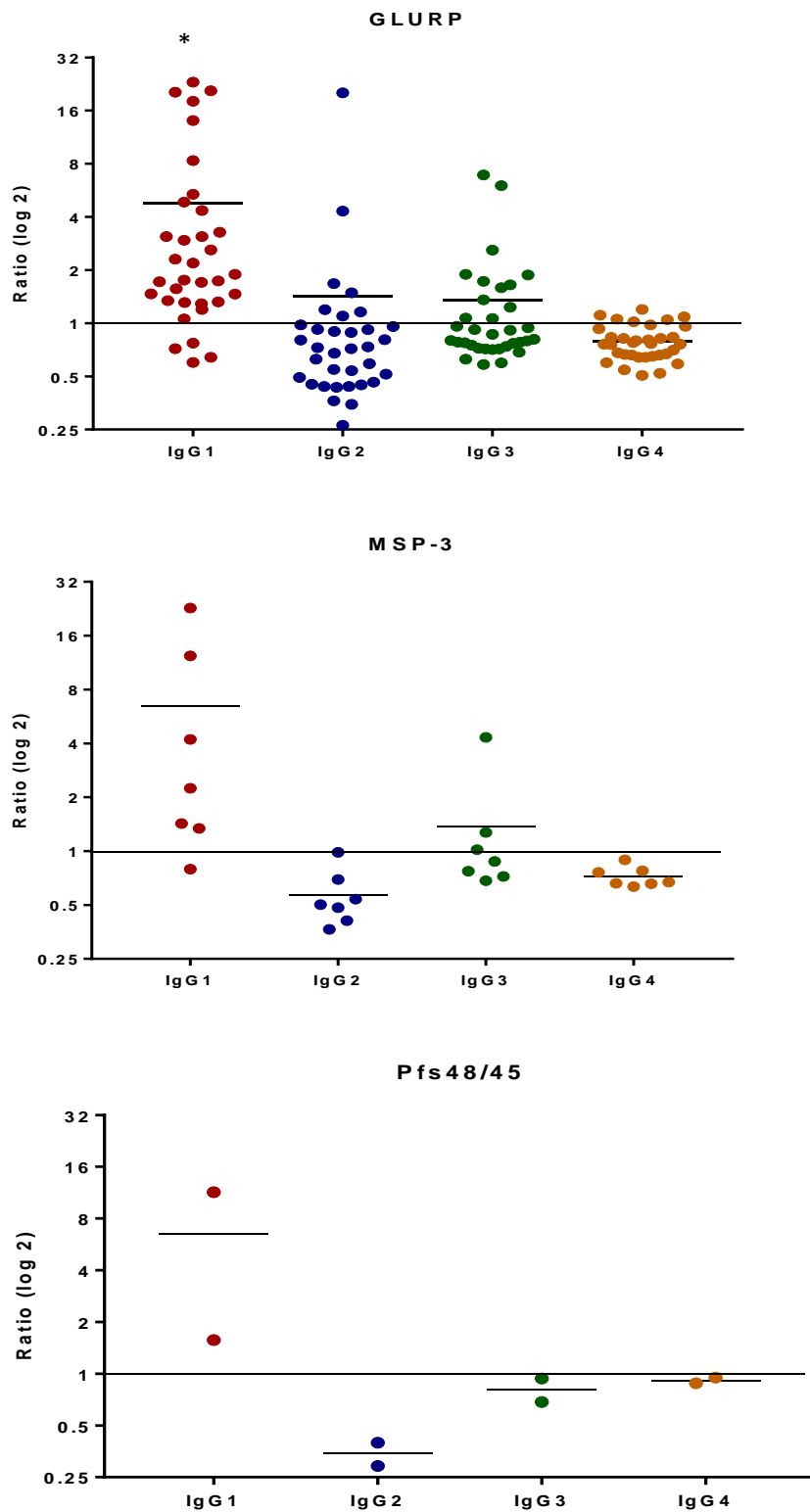


Figura 5.17: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 no grupo ML (Mâncio Lima). *P < 0.0001 IgG1 versus IgG2, IgG3 e IgG4. Linhas representam média.

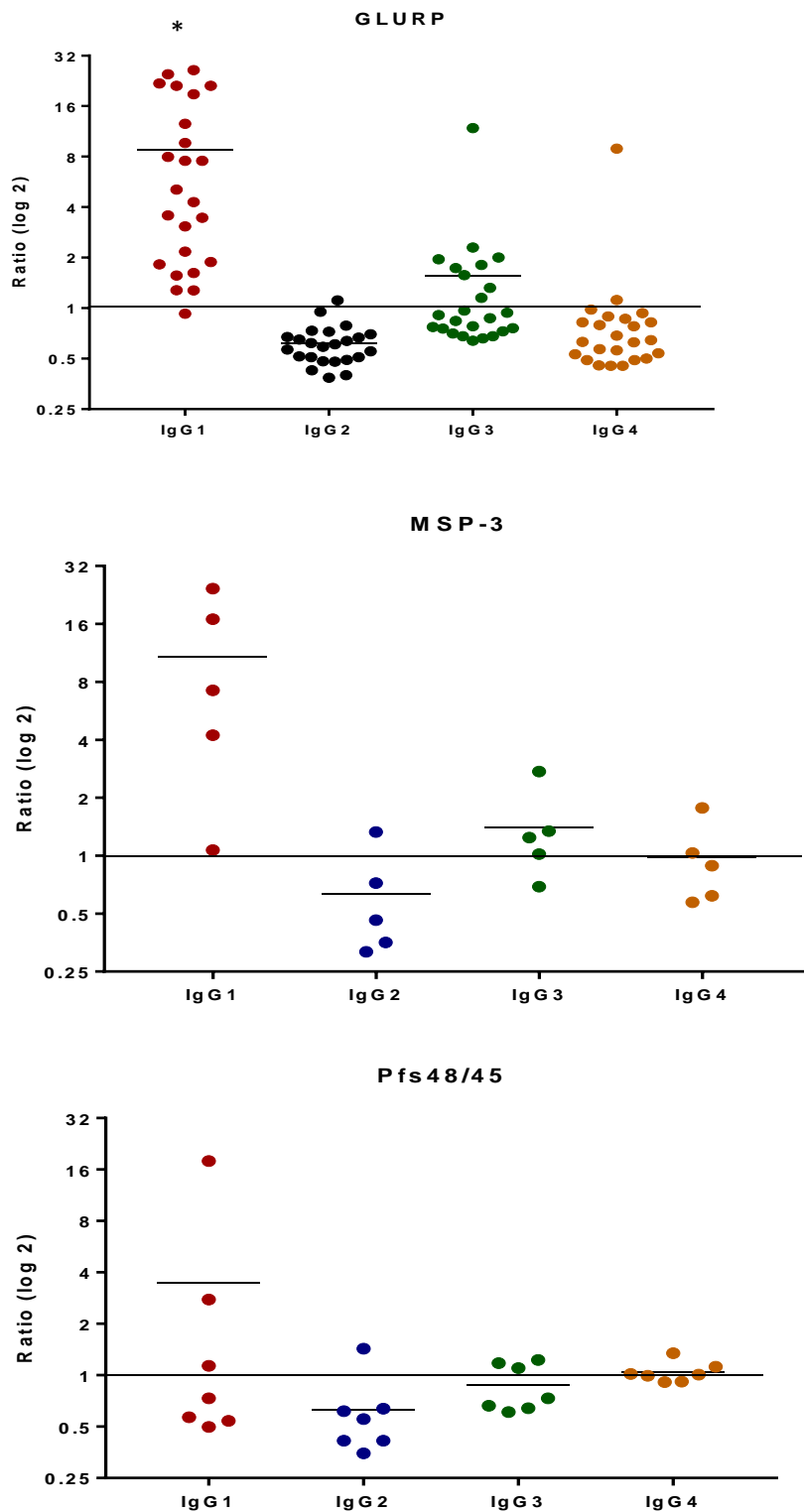


Figura 5.18: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 no grupo GJ (Guajará).* $P < 0.0001$, IgG1 *versus* IgG2, IgG3 e IgG4. Linhas representam média.

Quando comparamos os níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a a GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 entre indivíduos parasitados por *P. falciparum* e não parasitados, independente do grupo, verificamos que os níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 contra a GLURP e IgG1 contra a MSP3 foram maiores nos indivíduos parasitados (GLURP: $P < 0.0001$, para IgG1; $P = 0.0004$, para IgG4. MSP-3, $P = 0.03$ para IgG1) (Figura 5.19).

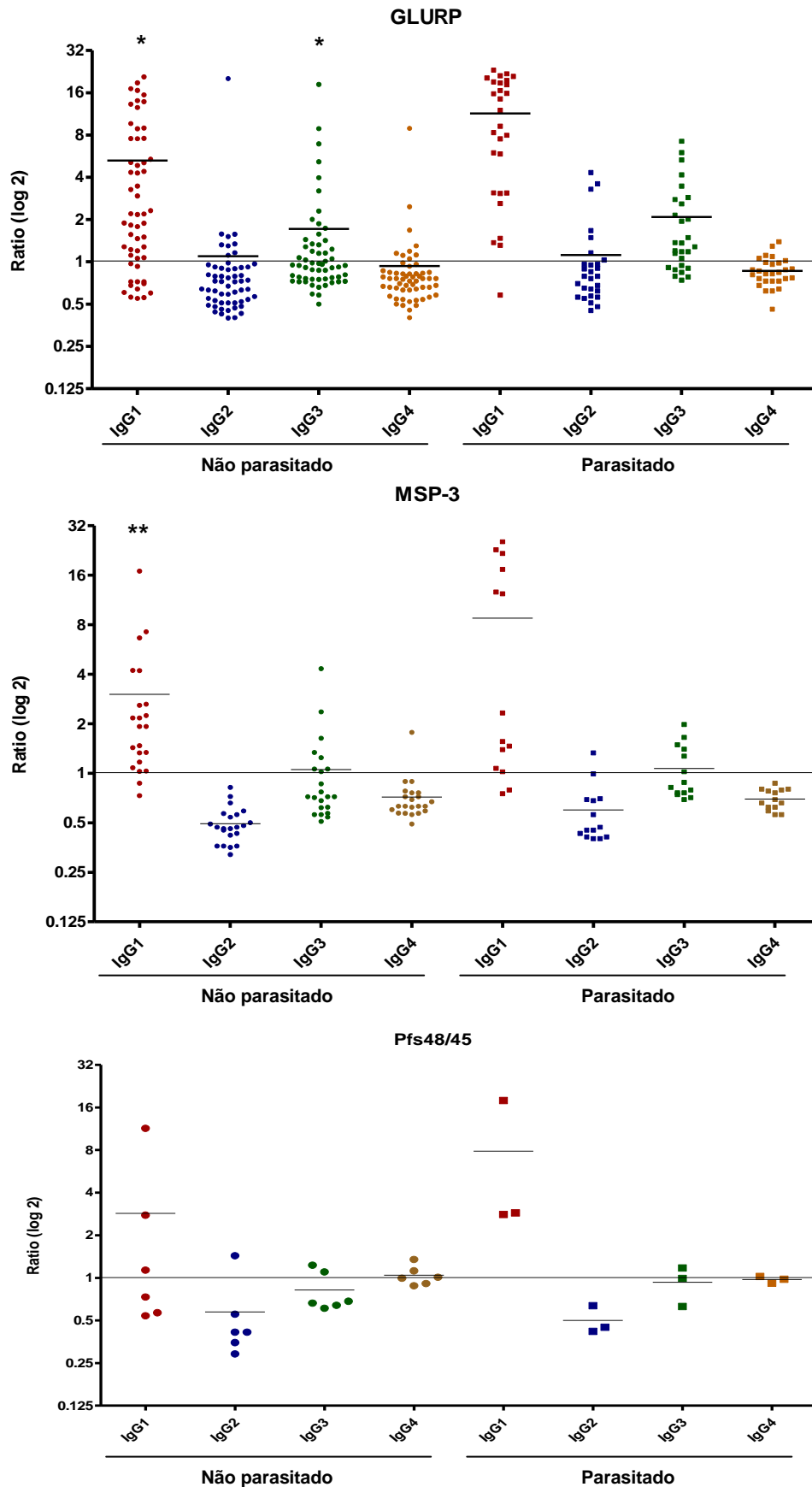


Figura 5.19: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 a GLURP, MSP-3 e Pf248/45 em indivíduos parasitados e não parasitados, independente do grupo. * $P < 0.0001$, não parasitado IgG1 versus parasitado IgG1; $P = 0.0004$, não parasitado IgG3 versus parasitado IgG3. ** $P = 0.03$, não parasitado IgG1 versus parasitado IgG1. Linhas representam média.

5.5. Mapeamento de epítomos B da GMZ2.6c nos grupos CZS, ML e GJ

O mapeamento de epítomos B da GMZ2.6c foi realizado em todas as amostras que apresentaram anticorpos para o componente correspondente (GLURP, MSP3 ou Pfs48/45). Foi realizada a pesquisa de anticorpos IgG contra 13 epítomos da GLURP (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, S2 e S3), 4 epítomos da MSP-3 (MSP3a, MSP3b, MSP3c E DG210) e 2 epítomos da Pfs48/45 (Pfs48/45a e Pfs48/45b).

Os indivíduos que apresentaram anticorpos contra os epítomos estudados (reativos) foram denominados de respondedores e aqueles que não apresentaram anticorpos contra os epítomos estudados (não reativos) foram chamados de não respondedores.

No grupo CZS, 19 % (11/57) dos indivíduos não apresentaram anticorpos para nenhum dos epítomos, 47% (27/57) apresentara anticorpos para 1-5 epítomos, 18% (10/57) apresentaram anticorpos para 6-9 epítomos e 16% (9/57) apresentaram anticorpos para > 9 epítomos. No grupo ML, 19% (7/37) dos indivíduos não apresentaram anticorpos para nenhum dos epítomos, 54% (20/37) apresentara anticorpos para 1-5 epítomos, 14% (5/37) apresentaram anticorpos para 6-9 epítomos e 14% (5/37) apresentaram anticorpos para > 9 epítomos. No grupo GJ, 18% (5/28) dos indivíduos não apresentaram anticorpos para nenhum dos epítomos, 54% (15/28) apresentaram anticorpos para 1-5 epítomos, 14% (4/28) apresentaram anticorpos para 6-9 epítomos e 14% (4/28) apresentaram anticorpos para > 9 epítomos (Tabela 5.7). Observamos, no grupo GJ, uma correlação positiva entre o número de peptídeos reconhecidos e a tempo da última infecção ($P = 0.02$, $r = 0.3858$).

Tabela 5.7. Frequência de indivíduos com anticorpos IgG nos grupos CZS, ML e GJ, de acordo com a quantidade de peptídeos reconhecidos.

Quantidade de peptídeos reconhecidos	Grupos		
	CZS (n = 57)	ML (n = 37)	GJ (n = 28)
0	11 (19%)	7 (19%)	5 (18%)
1 – 5	27 (47%)	20 (54%)	15 (54%)
6 – 9	10 (18%)	5 (14%)	4 (14%)
>9	9 (16%)	5 (14%)	4 (14%)

CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; n: número.

As frequências de indivíduos com anticorpos IgG contra os peptídeos da GLURP, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, S2 e S3 foram, respectivamente 22% (10/46), 15% (7/46), 35% (16/46), 26% (12/46), 22% (10/46), 11% (5/46), 37% (17/46), 24% (11/46), 10% (4/46), 11% (5/46), 57% (26/46), 13% (6/46) e 9% (4/46), no grupo CZS, 9% (3/34), 9% (3/34), 44% (15/34), 44% (15/34), 44% (15/34), 3% (1/34), 21% (7/34), 41% (14/34), 6% (2/34), 15% (5/34), 44% (15/34), 30% (10/34) e 12 (4/34), no grupo ML e 25% (6/24), 21% (5/24), 33% (8/24), 17% (4/24), 17% (4/24), 17% (4/24), 17% (4/24), 33% (8/24), 14% (3/24), 21% (5/24), 50% (12/24), 17% (4/24) e 21% (5/24), no grupo GJ. As frequências de indivíduos com anticorpos IgG contra os peptídeos da MSP3, MSP3a, MSP3b, MSP3c e DG210 foram, respectivamente 29% (9/31), 23% (7/31), 26% (8/31) e 32% (10/31), no grupo CZS, 29% (2/7), 43% (3/7), 29% (2/7) e 51% (4/7), no grupo ML e 20% (1/5), 60% (3/5), 60% (3/5) e 60% (3/5), no grupo GJ. As frequências de indivíduos com anticorpos IgG contra os epítomos da Pfs48/45, Pfs48/45a e Pfs48/45b foram, respectivamente, 50% (1/2) e 50% (1/2), no grupo CZS, 100% (2/2) e 100% (2/2), no grupo ML e 51% (4/7) e 29% (2/7), no grupo GJ (Figura 5.20).

No grupo CZS, indivíduos com anticorpos IgG contra o epítomo P11 foram mais frequentes que indivíduos com anticorpos contra os epítomos P1, P2, P4, P5, P6, P8, P9, P11, S2, S3, MSP3a, MSP3b e MSP3c ($P < 0.05$, para todas as análises). Também no grupo CZS, indivíduos com anticorpos contra o epítomos P3, P7 e DG210 foram mais frequentes que indivíduos com anticorpos contra os epítomos P6, P9, P10, S2 e S3 ($P < 0.05$, para todas as análises). No grupo ML, indivíduos com

anticorpos IgG contra o epítopo P11 foram mais frequentes que indivíduos com anticorpos contra os epítopos P1, P2, P6, P10, S3 e DG210 ($P < 0.05$, para todas as análises). Também no grupo ML, indivíduos com anticorpos IgG contra os epítopos P3, P4 e P5 foram mais frequentes que indivíduos com anticorpos contra os epítopos P2, P6, P9, P10 e S3 ($P < 0.05$, para todas as análises). No grupo GJ, indivíduos com anticorpos IgG contra o epítopo P11 foram mais frequentes que indivíduos com anticorpos contra os epítopos P4, P5, P6, P7 e P9 ($P < 0.05$ para todas as análises).

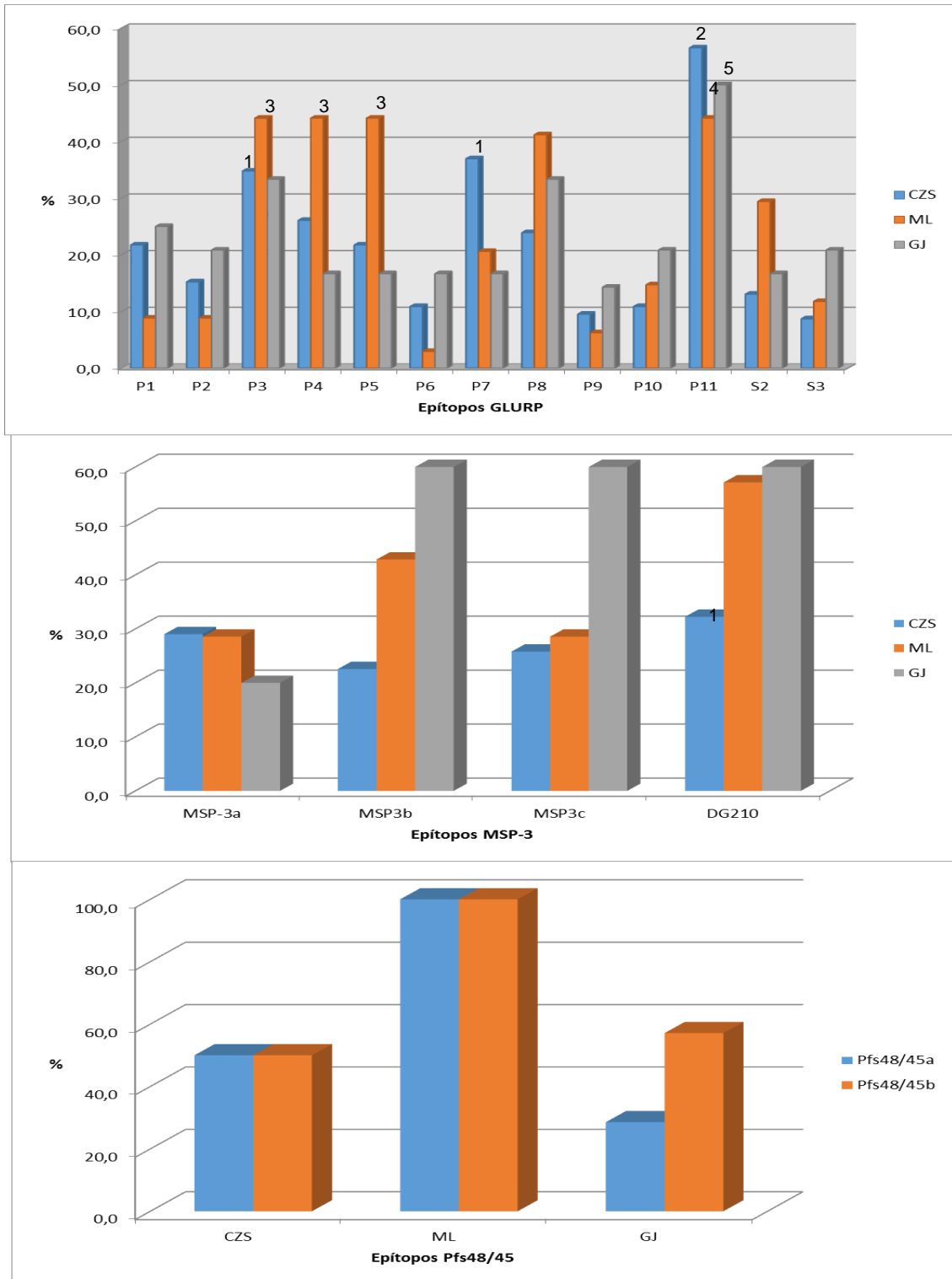


Figura 5.20: Frequência de indivíduos com anticorpos IgG para os epítos B derivados da GMZ2.6c, nos grupos CZS, ML e GJ. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; ¹P < 0.05 CZS P3, P7 e DG210 *versus* CZS, P6, P9, P10, S2 e S3. ²P < 0.05 CZS P11 *versus* CZS P1, P2, P4, P5, P6, P8, P9, P11, S2, S3. ³P < 0.05, ML P3, P4 e P5 *versus* ML P2, P6, P9, P10 e S3. ⁴P < 0.05, ML P11 *versus* ML P1, P2, P6, P10, S3 e DG210. ⁵P < 0.05, GJ P11 *versus* P4, P5, P6, P7 e P9.

No grupo CZS, verificamos maiores níveis de anticorpos IgG contra o epítopo P11 quando comparado com os níveis de IgG contra os epítomos P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, S2, S3, MSP3b, MSP3c e DG210 ($P < 0.05$, para todas as análises). Níveis de anticorpos IgG contra o epítopo P3 foram maiores que níveis de anticorpos IgG contra os epítomos P6, P8, P9, P10, S2 e S3 ($P < 0.05$, para todas as análises). Níveis de anticorpos IgG para o epítopo MSP3a foram maiores que níveis de anticorpos contra os epítomos P2, P4, P5, P6, P8, P9, P10, S2 e S3 enquanto que os níveis de anticorpos contra os epítomos MSP3c e DG210 foram maiores que os níveis de anticorpos contra os epítomos P6, P8, P9, P10, S2 e S3 ($P < 0.05$ para todas as análises) (Figura 5.21). No grupo ML, os níveis de anticorpos IgG contra os epítomos P3 e P11 foram maiores que os níveis de anticorpos IgG contra os epítomos P1, P2, P6, P7, P9, P10, S2 e S3 ($P < 0.05$, para todas as análises) (Figura 5.22). No grupo GJ, observamos maiores níveis de anticorpos IgG contra o epítopo P3 quando comparado com os níveis de anticorpos IgG contra os epítomos P6, P7, P8, S2 e S3 enquanto que os níveis de anticorpos IgG contra os epítomos P4 e P11 foram maiores que os níveis de anticorpos IgG contra os epítomos P1, P2, P5, P6, P7, P8, P9, P10, S2 e S3 ($P < 0.05$, para todas as análises) (Figura 5.23).

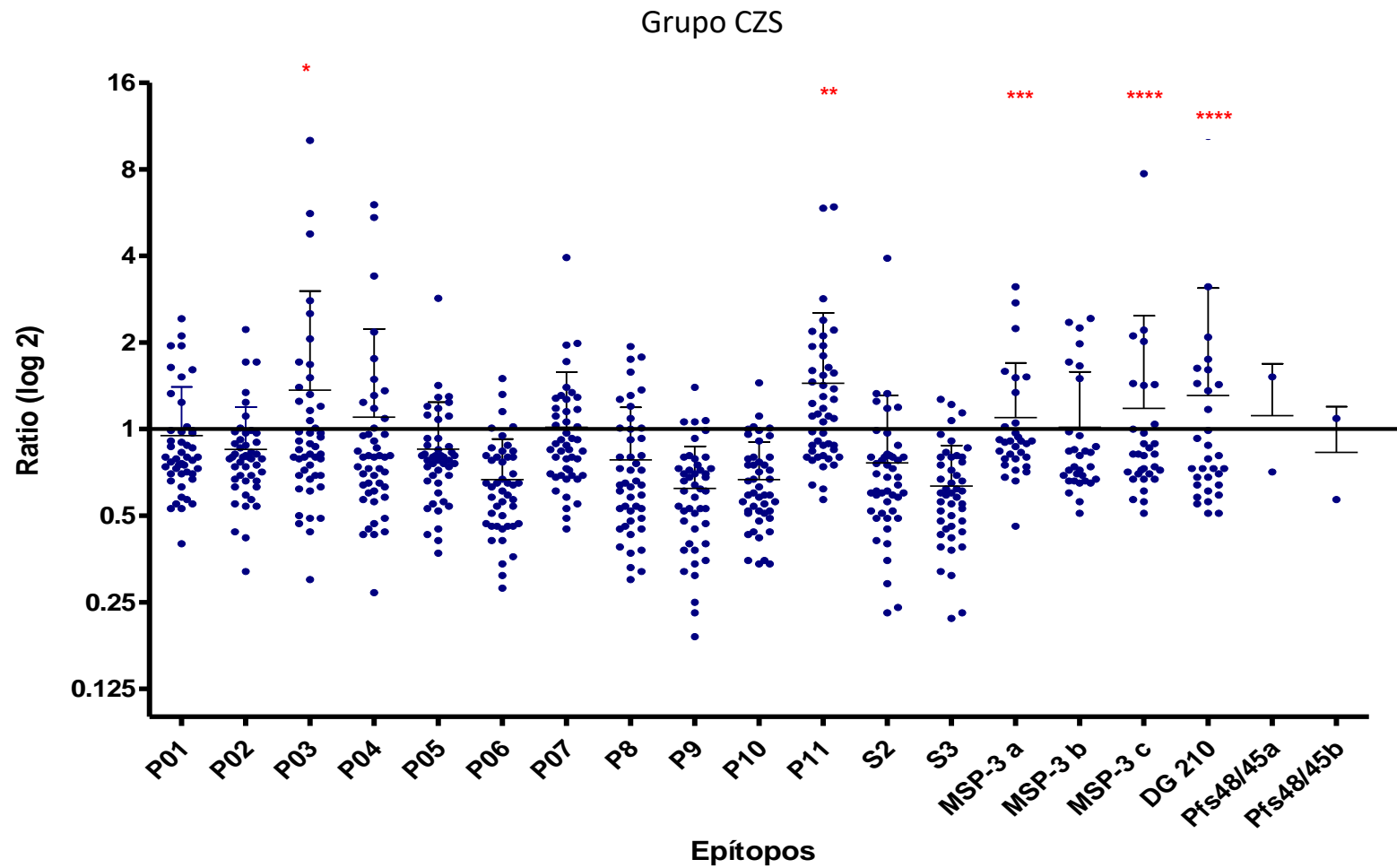


Figura 5.21: Níveis de anticorpos IgG contra os epítupos da GMZ2.6c no grupo CZS. CZS: Cruzeiro do Sul; * $P < 0.05$, P3 *versus* P6, P8, P9, P10, S2 e S3. ** $P < 0.05$, P11 *versus* P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, S2, S3, MSP3b, MSP3c e DG210. *** $P < 0.05$, MSP3a *versus* P2, P4, P5, P6, P8, P9, P10, S2 e S3. **** $P < 0.05$, MSP3c e DG210 *versus* P6, P8, P9, P10, S2 e S3. Linhas representam média e desvio padrão.

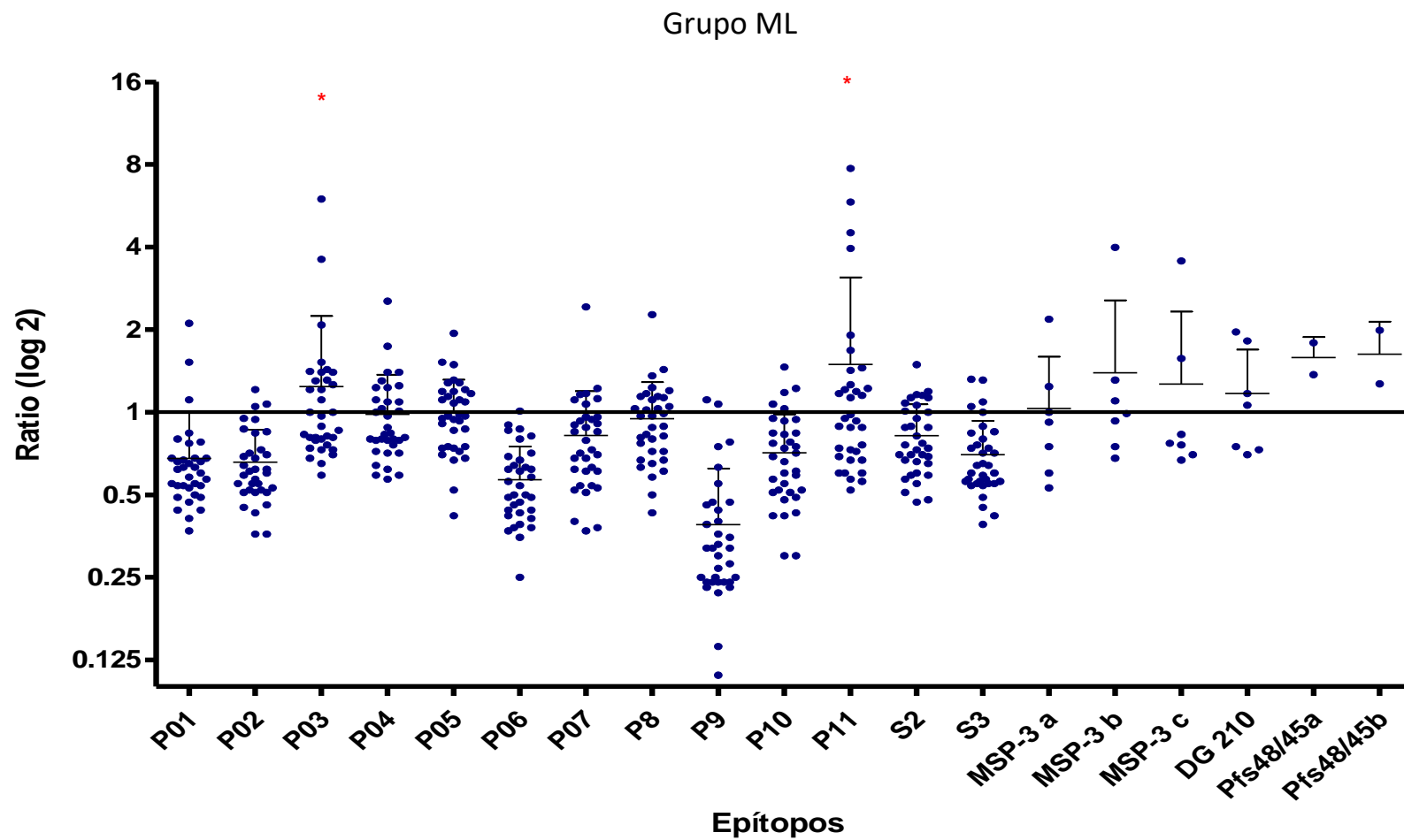


Figura 5.22: Níveis de anticorpos IgG contra os epítapos da GMZ2.6c no grupo ML. ML: Mâncio Lima; * $P < 0.05$, P3 e P11 *versus* P1, P2, P6, P7, P9, P10, S2 e S3. Linhas representam média e desvio padrão.

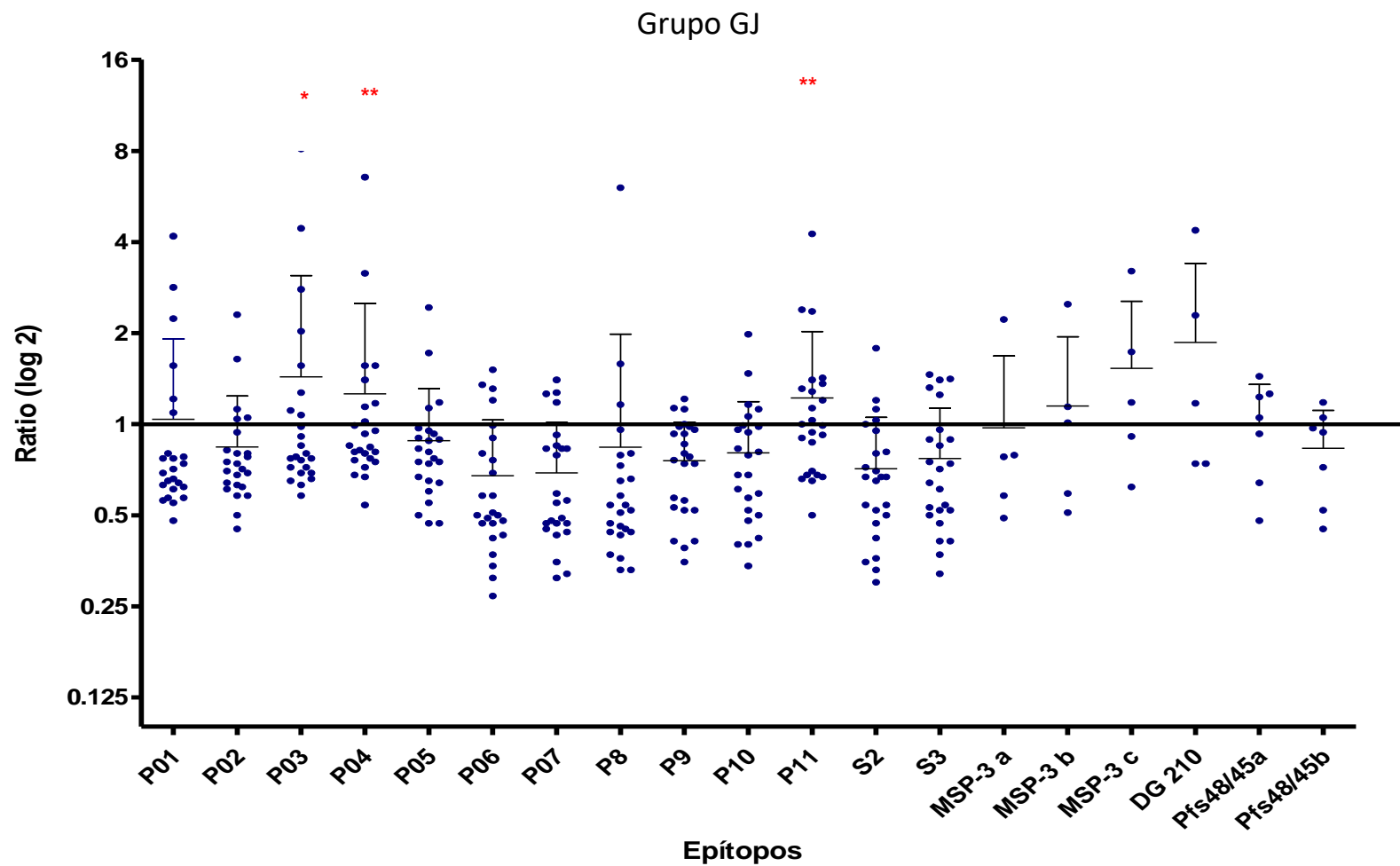


Figura 5.23: Níveis de anticorpos IgG contra os epítapos da GMZ2.6c no grupo GJ. *P < 0.05, P3 *versus* P6, P7, P8, S2 e S3; **P < 0.05, P4 e P11 *versus* P1, P2, P5, P6, P7, P8, P9, P10, S2 e S3. Linhas representam média e desvio padrão.

5.6. Avaliação da resposta IgG contra a GMZ2.6c, seus componentes e os epítomos B nos grupos CZS, ML e GJ, antes (D0) e após o tratamento (D15).

Vinte dos 43 indivíduos com diagnóstico positivo para *P. falciparum* tiveram amostras coletadas no dia do diagnóstico antes do início do tratamento (D0), e 15 dias após o início do tratamento (D15). A pesquisa de anticorpos IgG, IgM, IgA, IgE e subclasses de IgG contra as proteínas GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 e a pesquisa de anticorpos IgG contra os epítomos da GMZ2.6c foi avaliada em D0 e D15.

Para GMZ2.6c, 17 amostras foram respondedoras na primeira e na segunda coleta, duas amostras foram respondedoras na primeira mas não respondedora na segunda coleta e uma amostras não respondeu nem na primeira nem na segunda coleta. Para GLURP, 16 amostras foram respondedoras na primeira e na segunda coleta e, das 4 não respondedoras na primeira coleta, duas passaram a responder e as outras duas continuaram não respondedoras. Para MSP3, oito amostras foram respondedoras na primeira e na segunda coleta, oito foram não respondedoras na primeira e na segunda coleta e, duas foram não respondedoras na primeira coleta e passaram a responder na segunda coleta e as outras duas foram respondedoras na primeira coleta e passaram a não responder na segunda coleta. Para Pfs48/45, cinco amostras foram respondedoras na primeira e na segunda coleta, 9 foram não respondedoras na primeira e na segunda coleta, duas foram respondedoras na primeira coleta e não respondedoras na segunda coleta e quatro foram não respondedoras na primeira coleta e respondedoras na segunda coleta (Tabela 5.8).

Para os epítomos da GMZ2.6c, a maior parte dos indivíduos analisados (> 70%) mantiveram o perfil de respondedor ou não respondedor para cada um dos epítomos B observado na primeira coleta, exceto para os epítomos P3, P4, MSP3b e Pfs48/45b (Tabela 5.9).

Tabela 5.8. Frequência de indivíduos respondedores e não respondedores para GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45, antes e após o tratamento

		2ª. COLETA		
		GMZ2.6c		
1ª. COLETA		R	NR	
	R	17 (85%)	2 (10%)	
	NR	0 (0%)	1 (5%)	
			GLURP	
		R	NR	
	R	16 (80%)	0 (0%)	
	NR	2 (10%)	2 (10%)	
			MSP-3	
		R	NR	
	R	8 (40%)	2 (10%)	
	NR	2 (10%)	8 (40%)	
			Pfs48/45	
		R	NR	
R	5 (25%)	2 (10%)		
NR	4 (20%)	9 (45%)		

R: Respondedor; NR: Não respondedor. Em vermelho estão indicados os números de indivíduos que mudaram o perfil respondedor/não respondedor.

Tabela 5.9. Frequência de indivíduos respondedores e não respondedores para os epitopos da GMZ2.6c, antes e após o tratamento.

		2ª. COLETA					
		P1		P2		P3	
R	R	3	1	1	0	4	2
	NR	1	15	1	18	6	8
		P4		P5		P6	
R	R	3	1	4	0	0	0
	NR	8	8	5	11	3	17
		P7		P8		P9	
R	R	1	3	1	4	0	0
	NR	2	14	0	15	1	19
		P10		P11		S2	
R	R	1	1	8	3	3	1
	NR	2	16	2	7	2	14
		S3		MSP-3a		MSP-3b	
R	R	2	0	4	3	3	2
	NR	1	17	3	10	5	10
		MSP-3c		DG210		Pfs48/45a	
R	R	6	2	7	1	3	4
	RN	4	8	5	7	1	12
		Pfs48/45b					
R	R	2	2				
	RN	5	11				

R: Respondedor; NR: Não respondedor. Em vermelho estão indicados os números de indivíduos que mudaram o perfil respondedor/não respondedor.

Quando comparamos a 1ª e 2ª coletas, não verificamos diferença nos níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GMZ2.6c, a GLURP e a MSP-3 (Figuras 5.23, 5.24 e 5.25). Entretanto, observamos maiores níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA contra a Pfs48/45 na 2ª coleta quando comparado com os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA contra a Pfs48/45 na 1ª coleta (Figura 5.26). Não observamos diferenças nos níveis de anticorpos IgG contra os epítomos da GMZ2.6c na quando comparamos a 1ª e 2ª coletas (Figura 5.27 A, B e C).

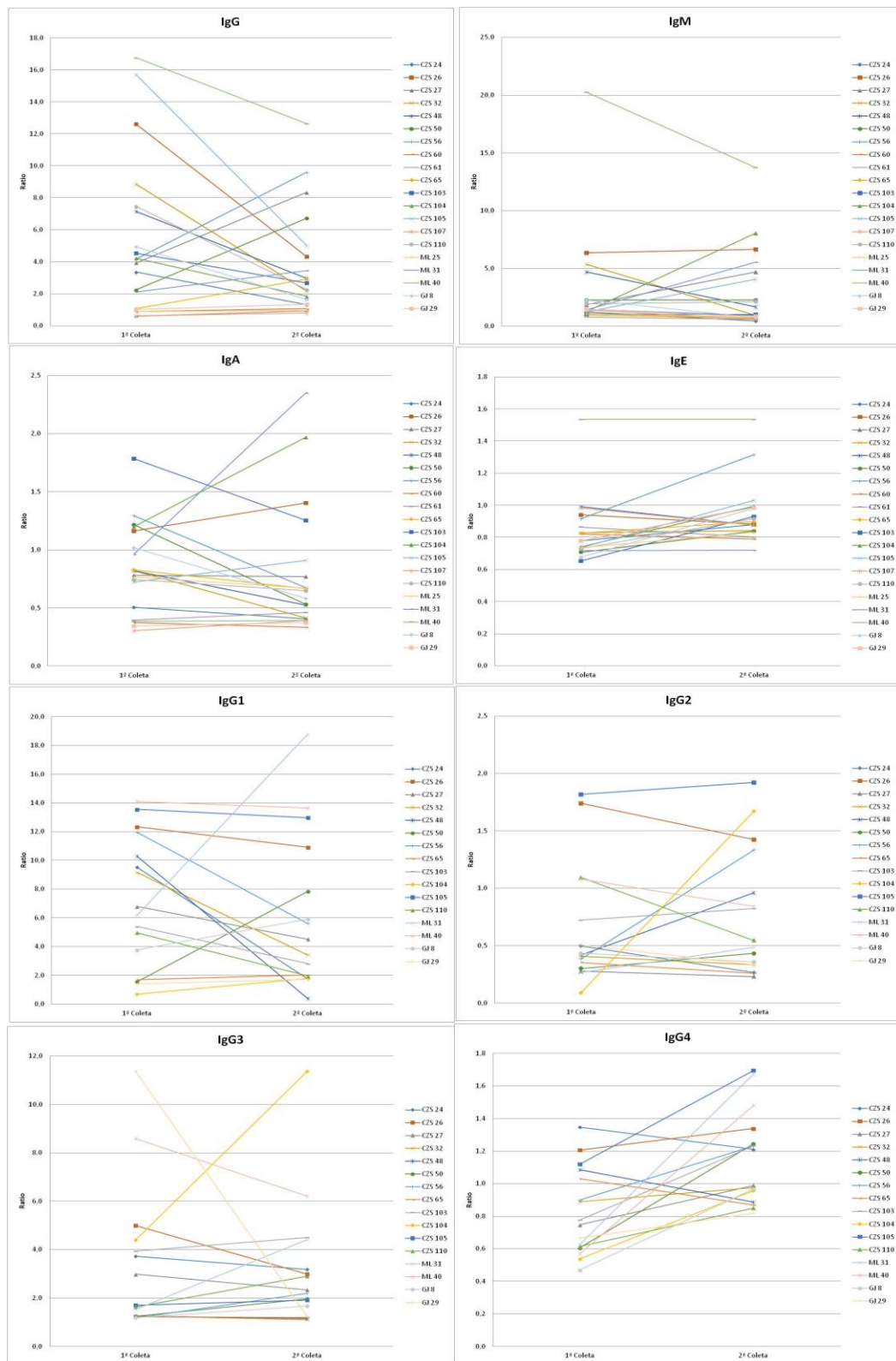


Figura 5.23: Níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG1, IgG3 e IgG4 contra GMZ2.6c na 1ª e 2ª coletas. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará.

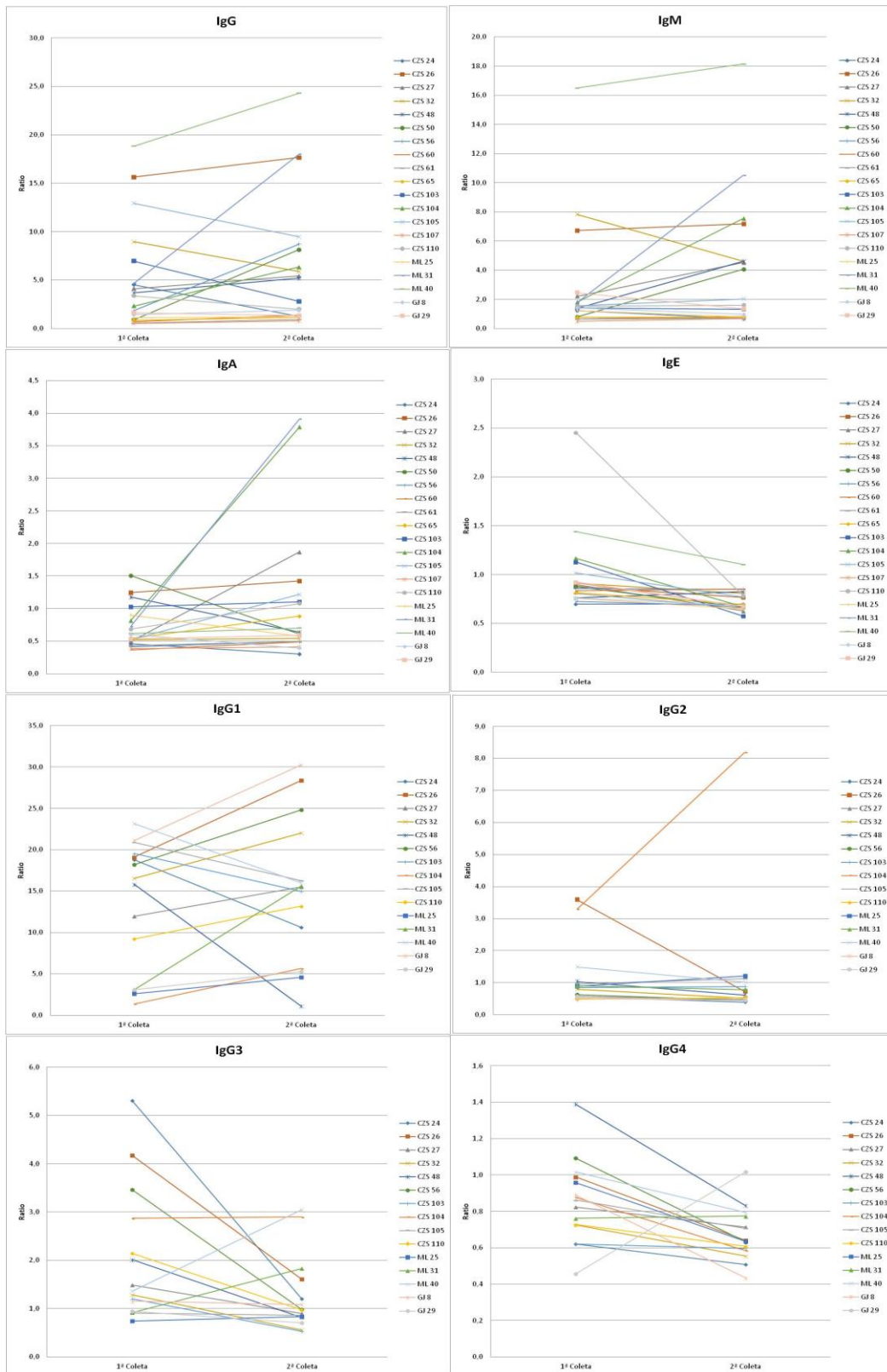


Figura 5.24: Níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG1, IgG3 e IgG4 contra GLURP na 1ª e 2ª coletas. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará.

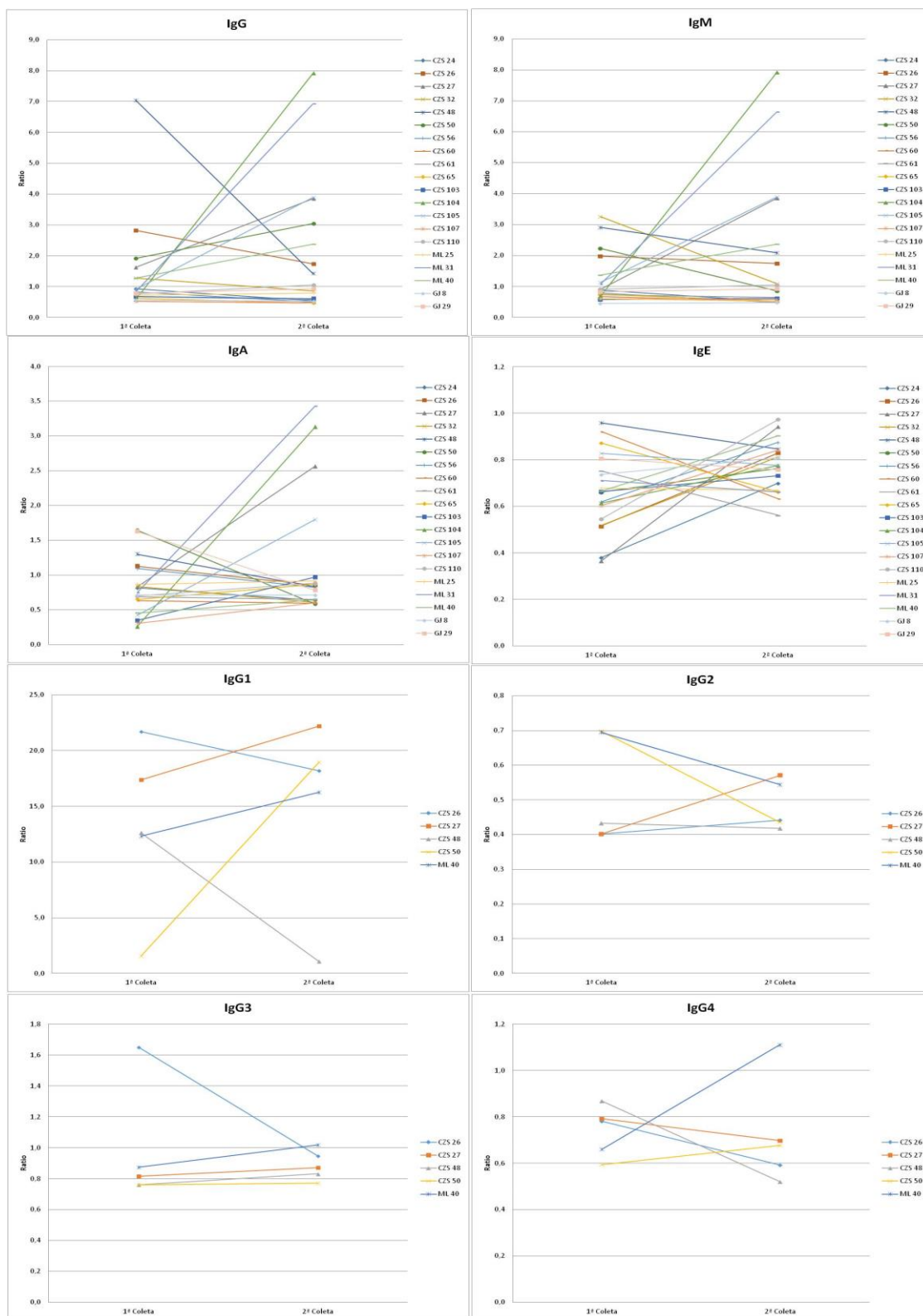


Figura 5.25: Níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG1, IgG3 e IgG4 contra a MSP-3 na 1ª. e 2ª. coletas. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará.

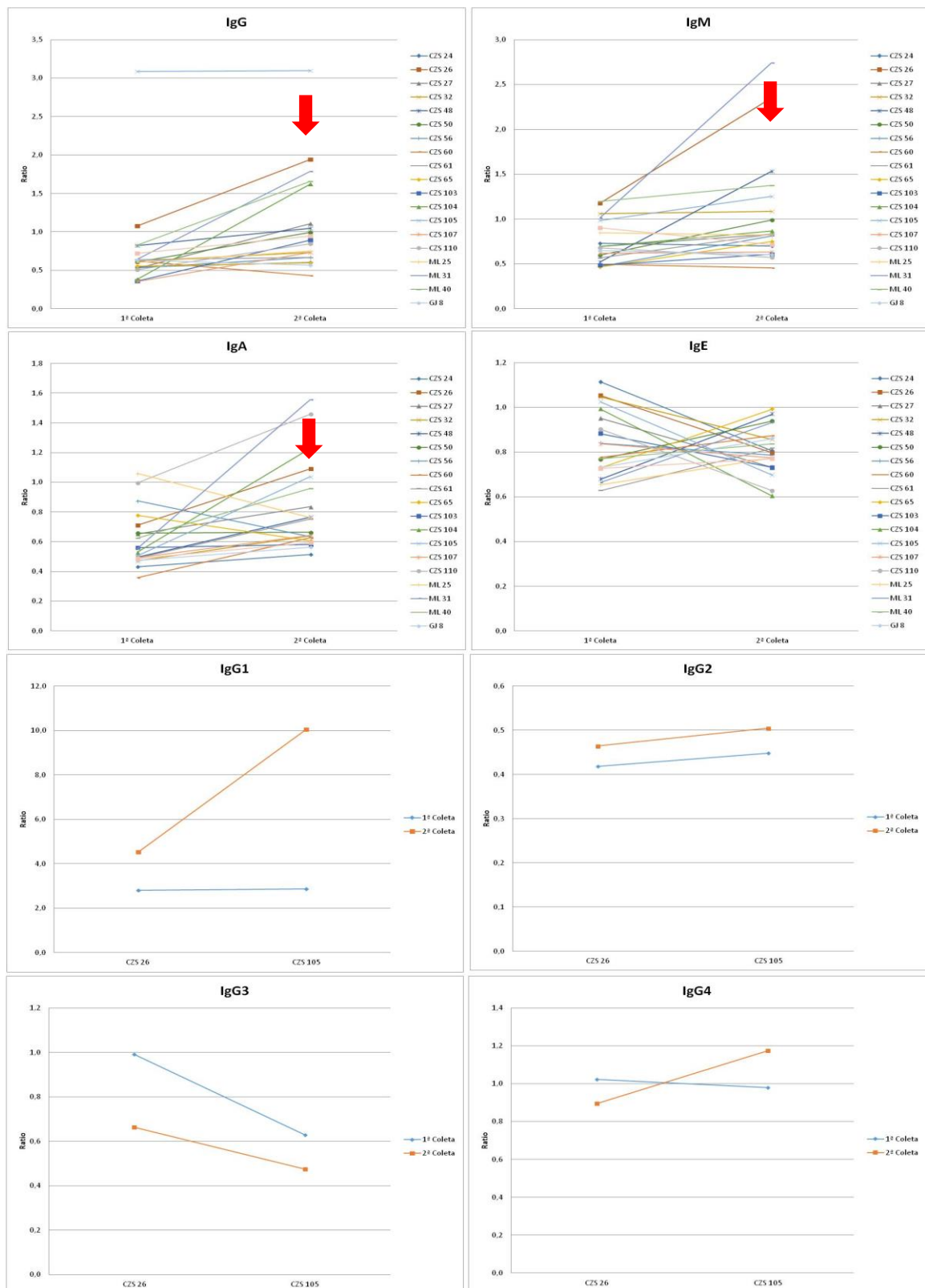
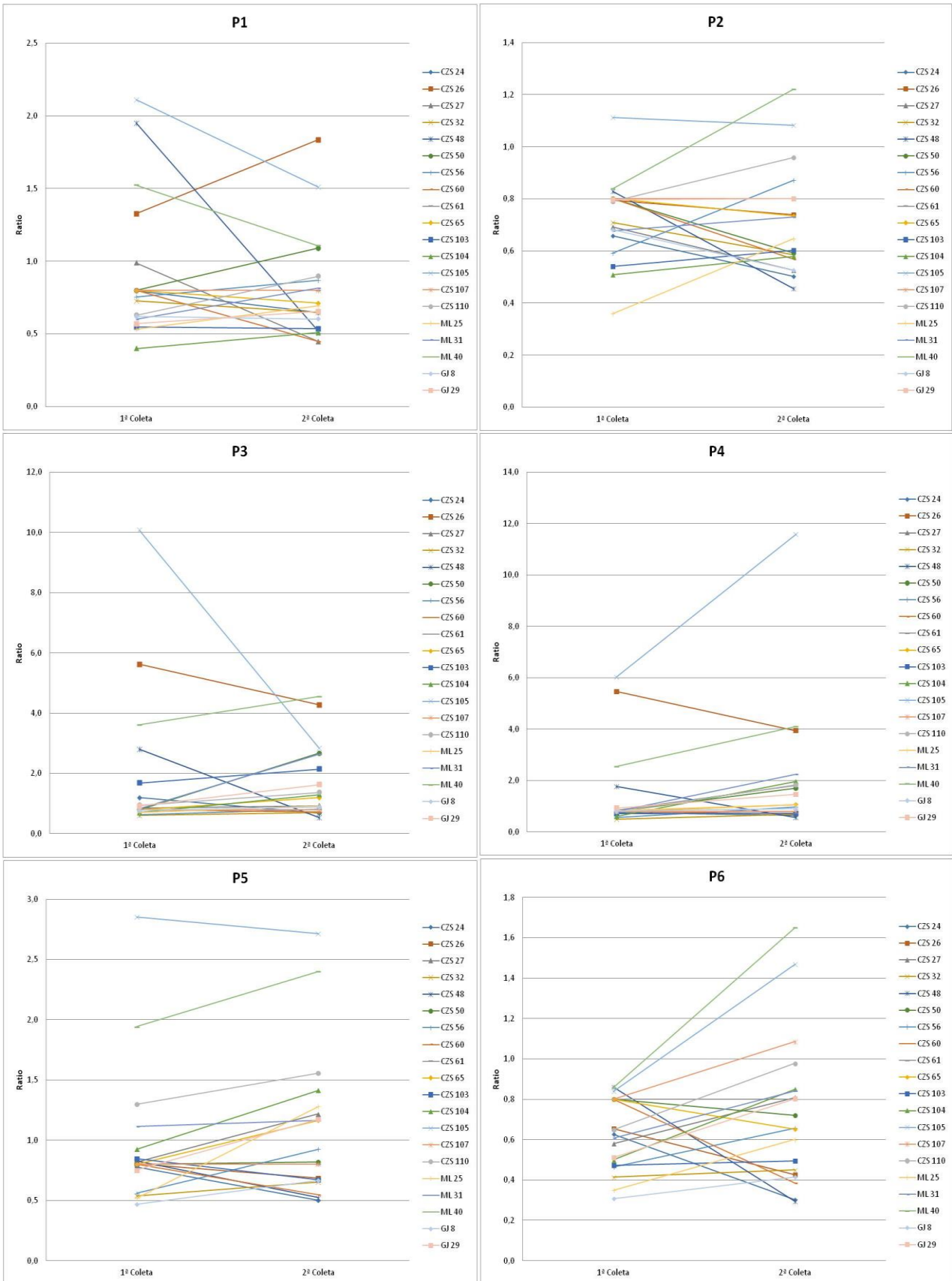
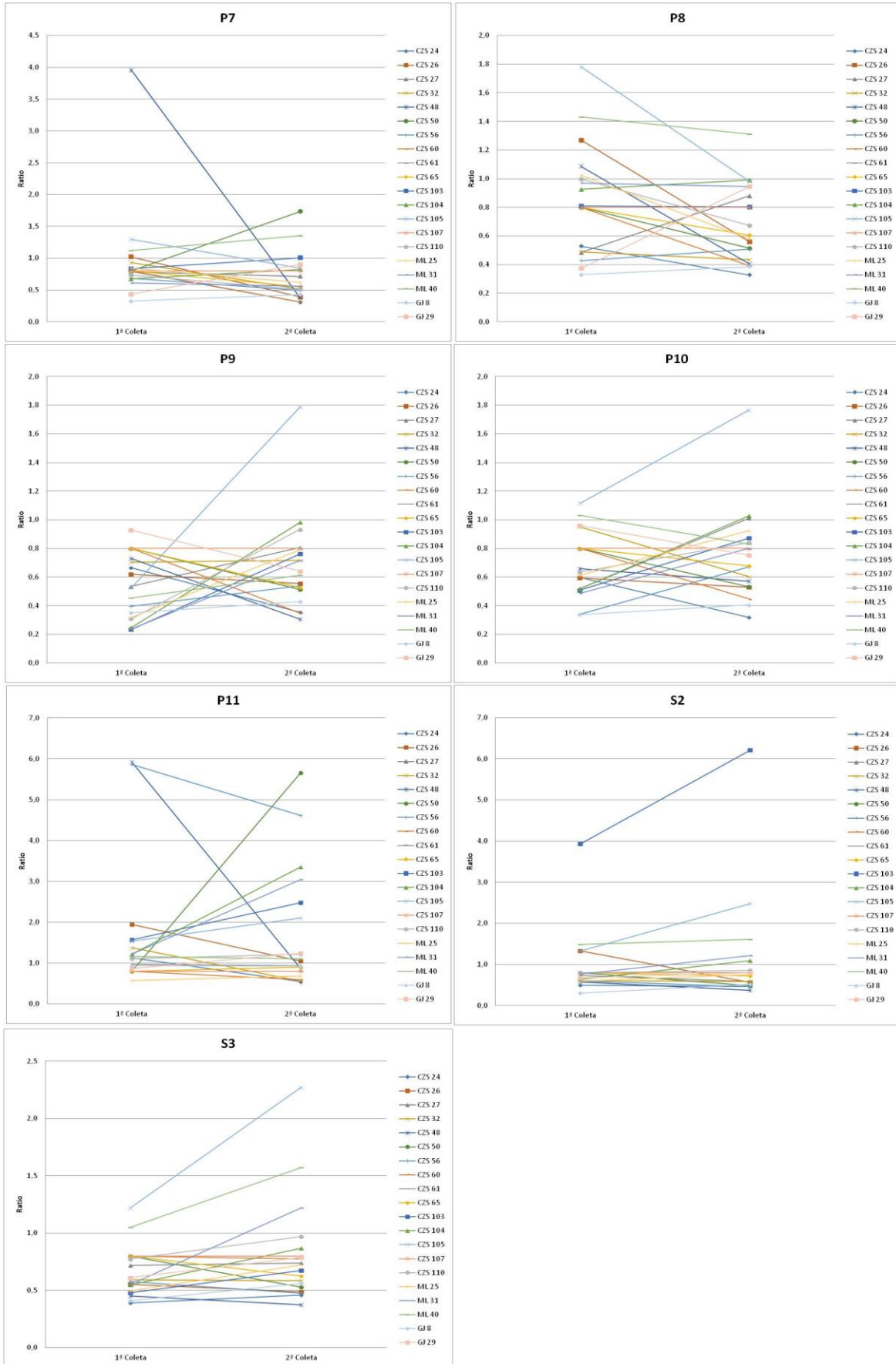


Figura 5.26: Níveis de anticorpos IgG, IgM, IgA, IgE, IgG1, IgG1, IgG3 e IgG4 contra a Pfs48/45 na 1ª. e 2ª. coletas. Setas vermelhas indicam maiores níveis de anticorpos na 2ª. coleta comparada com a 1ª. coleta. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará.

A



B

C

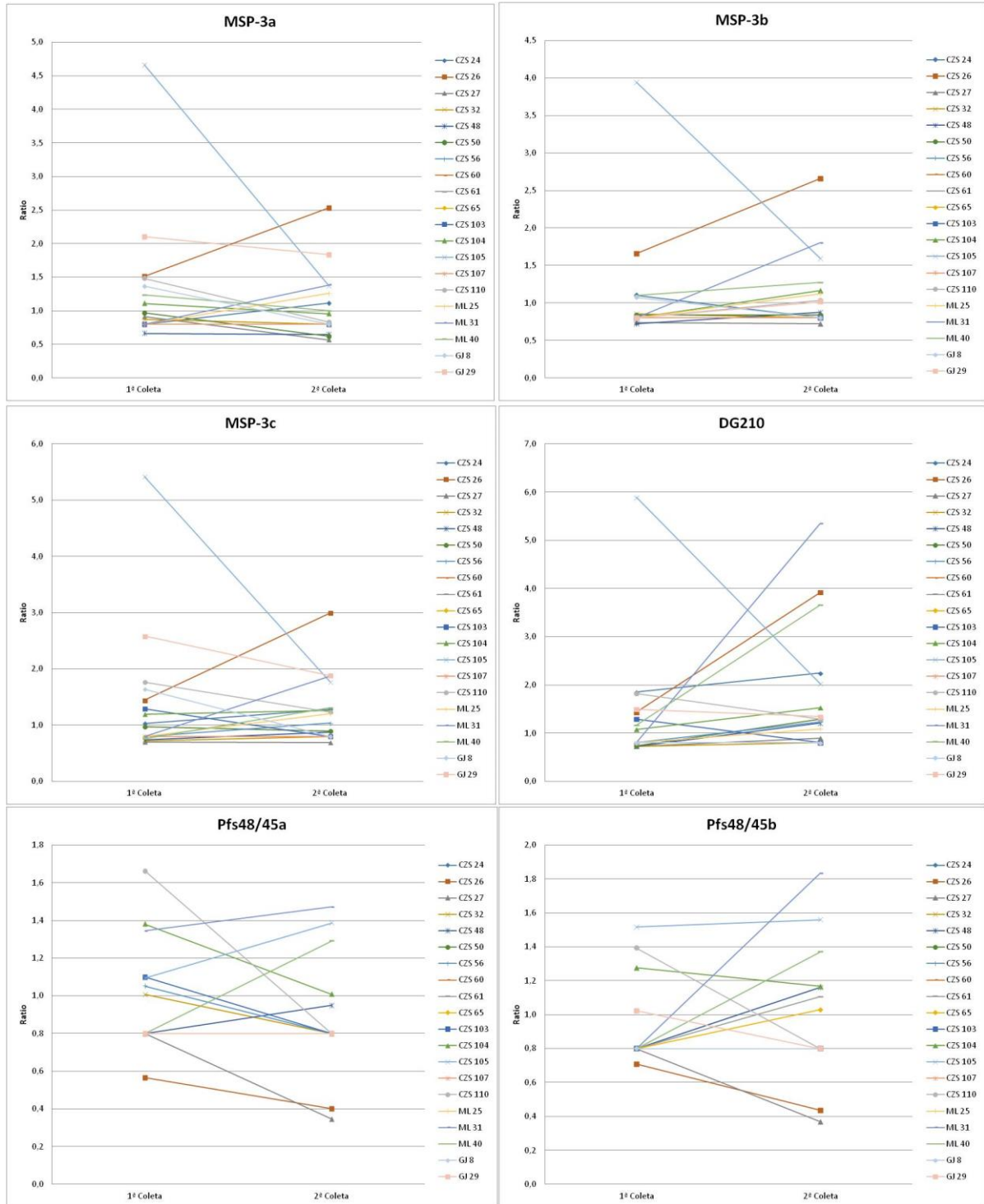


Figura 5.27 A, B e C: Níveis de anticorpos IgG contra os epítomos da GMZ2.6c na 1ª. e 2ª. coletas. CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará.

6. DISCUSSÃO

Com a possibilidade crescente do aumento da resistência dos plasmódios aos antimaláricos atualmente disponíveis e dos anofelinos aos inseticidas (5), uma estratégia alternativa de grande impacto no controle da transmissão da malária seria a imunoprofilaxia. Assim, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária tem sido uma das principais prioridades de pesquisa para o enfrentamento desse problema. O desenvolvimento de uma vacina antimalárica tem focado, principalmente, em antígenos únicos. Dada a complexidade do ciclo evolutivo do parasito, as complexas interações parasito-hospedeiro durante o curso da infecção, a extensa variabilidade genética do parasito e os mecanismos utilizados pelo plasmódio para evadir a resposta imune do hospedeiro, uma vacina ideal contra a malária deveria ser direcionada contra vários antígenos expressos em diferentes estágios do desenvolvimento do parasito (152). As abordagens adotadas para desenvolver uma vacina antimalárica baseada em sub-unidades, multiantigênica, multiestágio e baseada em peptídeos sintéticos tem mostrado resultados promissores (153). Nesse sentido, a proteína GMZ2 tem se mostrado uma candidata a vacina antimalárica promissora.

A GMZ2 é uma proteína recombinante que contém 2 antígenos de *Plasmodium falciparum* candidatos a vacina antimalárica, a GLURP, expressa em todas as fases do protozoário no hospedeiro vertebrado, e MSP-3, expressa durante a fase eritrocítica. O racional para combinação desses dois antígenos é baseado em uma série de estudos imunoepidemiológicos realizados em diferentes áreas endêmicas de malária, estudos funcionais *in vitro* e pré-clínicos em primatas não humanos (78). A GMZ2 está sendo testada em ensaios clínicos de Fase Ib/IIb e os dados mostraram que a GMZ2 é bem tolerada, segura e imunogênica e que os anticorpos induzidos após a imunização são específicos e funcionais, capazes de controlar o crescimento *in vitro* do *P. falciparum* em presença de monócitos (79–82). Além disso, estudos imunoepidemiológicos demonstraram alta frequência e títulos de anticorpos naturalmente adquiridos contra a GMZ2 e seus componentes em indivíduos residentes em área de alta endemicidade de malária na África (84). Considerando que uma vacina contra as formas eritrocíticas sexuadas poderia afetar a transmissão da malária, o fragmento 6c do antígeno de gametócito Pfs48/45 foi

geneticamente fusionado a GMZ2, gerando a GMZ2.6c, uma candidata também a vacina bloqueadora de transmissão (117). Esse é o primeiro trabalho que avalia a resposta imune naturalmente adquirida contra a GMZ2.6c em áreas endêmicas de malária.

No presente trabalho, procuramos estudar, sob diversos aspectos, o perfil de anticorpo para a proteína recombinante vacinal GMZ2.6c de *Plasmodium falciparum* em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária brasileira, com diferentes níveis de transmissão. A resposta imune humoral contra a proteína GMZ2.6c e seus fragmentos, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45, foi avaliada em indivíduos residentes em três cidades da Amazônia Brasileira: Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima, no Acre, e Guajará, no Amazonas. Essas áreas foram selecionadas, pois estão entre as 10 cidades que concentram 70% da malária por *P. falciparum* no país. Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima são consideradas áreas de alta endemicidade de malária (IPA > 50) e Guajará é considerada área de média endemicidade (IPA >10 e < 50).

Os indivíduos de Cruzeiro do Sul (CZS), Mâncio Lima (ML) e Guajará (GJ) eram similares na distribuição por sexo, idade, procedência e exposição prévia ao *Plasmodium*, embora os indivíduos do grupo ML tenham relatado uma maior média de número de infecções anteriores de malária que os indivíduos dos grupos GJ e CZS, mesmo sendo CZS uma cidade de alta endemicidade (IPA > 50) como ML. A maior parte dos indivíduos declarou infecção anterior tanto por *P. falciparum* quanto por *P. vivax*. Entretanto, a espécie plasmodial infectante mais frequente foi *P. vivax*, refletindo o atual cenário de malária no Brasil, onde *P. vivax* é responsável por cerca de 88% das infecções (13).

Nosso trabalho mostrou que 83,9 % (104/124) dos indivíduos de CZS, 73,8 % (65/88) dos indivíduos de ML e 72,4 % (63/87) dos indivíduos de GJ apresentavam anticorpos que reconheciam a GMZ2.6c, independente da classe de anticorpo, indicando que a GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos nos indivíduos residentes nas áreas estudadas. Essa antigenicidade da GMZ2.6c parece ser independente do nível de endemicidade da área, visto que Mâncio Lima e Cruzeiro do Sul, que são áreas de alta endemicidade e Guajará, que é considerada área de média endemicidade, apresentaram frequências similares de indivíduos com anticorpos que reconheciam a GMZ2.6c.

A não detecção de anticorpos anti-GMZ2.6c em 20/124 indivíduos de CZS, 23/88 indivíduos de ML e de 24/87 indivíduos de GJ poderia estar associada a ausência de um contato anterior com o parasito. Entretanto, dos 20 indivíduos de CZS que não apresentaram anticorpos anti-GMZ2.6c, apenas 2 relataram nunca ter tido malária e apenas 4 indivíduos relataram infecção prévia apenas por *P. vivax*. Dos 23 indivíduos de ML que não apresentaram anticorpos anti-GMZ2.6c, todos relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença e 4 relataram infecção prévia apenas por *P. vivax*. Dos 24 indivíduos do grupo GJ que não apresentaram anticorpos anti-GMZ2.6c, apenas 2 relataram nunca ter tido malária e 5 relataram exposição prévia apenas por *P. vivax*. Os demais indivíduos dos 3 grupos que não apresentaram anticorpos que reconheciam a GMZ2.6c relataram pelo menos uma infecção por *P. falciparum*. Poderíamos supor, então, que a falta de anticorpos anti-GMZ2.6c estaria relacionada a imunodepressão associada à malária já relatada em humanos (154,155), porém essa hipótese parece pouco provável, pois os indivíduos que não apresentavam anticorpos anti-GMZ2.6c apresentavam anticorpos para outros antígenos de *P. falciparum* (dados não mostrados). Outra hipótese é que fatores genéticos (como moléculas Complexo Principal de Histocompatibilidade, moléculas envolvidas no processamento do antígeno, receptores de células T) ou não (como a intensidade de infecção, o *status* imunológico e o *status* nutricional do indivíduo) podem influenciar no desenvolvimento ou não da resposta imune contra antígenos plasmodiais.

Anticorpos anti-GMZ2.6c foram observados em 3 dos 53 (5,7 %) indivíduos do grupo CO (controle de área). Esse fato não era esperado visto que nenhum dos indivíduos recrutados como controle não relataram histórico de malária por *P. falciparum* ou por *P. vivax*. Dois desses indivíduos são naturais do Acre e residem em área endêmica de malária há 20 e 18 anos. O outro indivíduo é natural do Amazonas e reside em área endêmica de malária há 23 anos. Assim, não podemos excluir que esses indivíduos tenham sido expostos à picada de mosquito infectante, sem desenvolvimento de sintomatologia.

Ensaio clínico em indivíduos *naive* (79) e em indivíduos naturalmente expostos à malária (80) para avaliar a segurança e a imunogenicidade da GMZ2, mostraram uma resposta mais potente contra a GMZ2, quando comparada com os componentes individuais. No nosso estudo, nas 3 populações estudadas, as maiores

frequências e níveis de anticorpos para a GMZ2.6c, quando comparado aos seus componentes individuais, sugere o efeito sinérgico de GLURP-R0, MSP-3 e Pfs48/45 e que a GMZ2.6c pode ser mais promissora como candidata a vacina antimalárica que os componentes individuais. Nossos dados corroboram os resultados obtidos por Mamo e colaboradores que observaram maior frequência e níveis de anticorpos contra a GMZ2 quando comparado com a GLURP e a MSP-3, observando o efeito sinérgico de MSP3 e GLURP-R0 em indivíduos naturalmente expostos à malária residentes na Etiópia (84).

Estudos independentes tem sido conduzidos para avaliar a resposta imune humoral contra a GLURP-R0 e a MSP-3 e seu potencial em conferir imunidade contra malária clínica em diferentes áreas endêmicas de malária na África, incluindo Senegal, Uganda, Burkina Faso, Gana, Quênia, Mianmar e Sudão. Além da localização geográfica, essas localidades diferem em intensidade de transmissão: alta, com mais de 200 picadas infectantes por pessoa por ano (Senegal, Uganda e Burkina Faso), média, com aproximadamente 10 picadas infectantes por pessoas por ano (Gana, Quênia e Mianmar) e baixa, com aproximadamente 2 a 3 picadas infectantes por pessoa por ano (Sudão). Esses estudos tem mostrado uma grande variedade de resultados em relação a imunogenicidade natural de GLURP-R0 e da MSP-3 (78). Alguns trabalhos relataram a maior imunogenicidade da MSP-3 quando comparada com a GLURP-R0 (132,133), enquanto em outros trabalhos, a GLURP-R0 foi mais imunogênica quando comparado com MSP-3 (115,156–158). No presente trabalho, a avaliação da resposta humoral contra os componentes individuais da GMZ2.6c, mostrou que tanto a GLURP-R0 quanto a MSP-3 são amplamente reconhecidas por anticorpos presentes no plasma das populações estudadas, sendo que a frequência de indivíduos respondedores para a GLURP-R0 (51%, 48% e 41% em CZS, ML e GJ, respectivamente) foi maior quando comparada a frequência de respondedores para a MSP-3 (39%, 27% e 13%, em CZS, ML e GJ, respectivamente). A diferença observada na imunogenicidade natural da MSP-3 e da GLURP-R0 pode ser resultado das diferenças observadas na exposição, idade e tempo de residência das populações estudadas visto que vários estudos tem demonstrado o efeito direto desses parâmetros no desenvolvimento da resposta imune antiplasmodial (111,156,159,160). Outra hipótese é que a diferença no *background* genético das populações estudadas esteja influenciando no

desenvolvimento da resposta imune à GLURP e à MSP-3. Estudos genéticos serão realizados para tentar avaliar essa possibilidade.

Anticorpos contra o antígeno Pfs48/45 são naturalmente adquiridos após exposição à infecção. As frequências de indivíduos com anticorpos que reconheciam o antígeno de gametócito Pfs48/45 foram CZS (27,4%), ML (34%) e GJ (21,8%). Essas frequências foram similares às frequências observadas por Ouédraogo e colaboradores que avaliaram a resposta anticorpo contra a Pfs48/45 em indivíduos residentes em área de alta endemicidade (Burkina Faso) e observaram que 22% dos indivíduos apresentavam anticorpos anti-Pfs48/45 e que a frequência da resposta aumentava significativamente durante a estação de transmissão, indicando o papel da presença ou recente exposição à antígenos do parasito no *booster* da imunidade contra antígenos de fase sexuada (148). Outro estudo realizado por Bousema e colaboradores avaliaram a resposta imune contra a Pfs48/45 em indivíduos residentes em área de baixa endemicidade de malária na Tanzânia e observaram que 15% dos indivíduos apresentavam anticorpos anti-Pfs48/45. Nossos dados diferem de estudos prévios que relataram que a frequência de anticorpos específicos para antígenos de fase sexuada do *Plasmodium* spp. é menor que a frequência de anticorpos específicos para as fases pré-eritrocítica e eritrocítica assexuada (113,114,148,161) visto que as frequências de indivíduos com anticorpos anti-Pfs48/45 e anti-MSP-3 foram similares. No nosso estudo, não foi realizada a detecção de gametócitos para avaliar se a presença de gametócitos estaria relacionada ao aumento da responsividade à Pfs48/45. Essa avaliação está em andamento no Laboratório.

Nosso trabalho mostrou que grande parte dos indivíduos dos grupos CZS, ML e GJ apresentava anticorpos IgG e IgM que reconheciam a GMZ2.6c. Nossos dados também mostraram que anticorpos IgG anti-GMZ2.6c foram mais frequentes no grupo CZS quando comparados com os grupos ML e GJ. Não apenas a frequência foi maior, como também os níveis de anticorpos IgG anti-GMZ2.6c foram mais elevados no grupo CZS. Considerando que é amplamente aceito que anticorpos IgG são os principais mediadores de proteção contra a malária clínica (117), podemos supor que anticorpos IgG estão relacionados com imunidade antiparasitária no grupo CZS. Entretanto, nenhuma associação foi observada entre a frequência ou níveis de

anticorpos IgG anti-GMZ2.6c e a presença ou ausência de sintomas no momento da coleta ou a com a densidade parasitária.

Entre os componentes da GMZ2.6c, GLURP-R0, MSP-3 e Pfs48/45, a GLURP-R0 foi a mais imunogênica na infecção natural e induziu uma resposta preferencialmente IgG, embora os grupos CZS, ML e GJ também tenham apresentado maiores frequências de indivíduos com anticorpos IgM anti-GLURP-R0 que indivíduos com anticorpos IgA e IgE anti-GLURP-R0. Estudos prévios realizados em nosso Laboratório avaliaram a resposta IgG contra as proteínas GLURP-R0 e MSP-3 em indivíduos residentes em área endêmica brasileira de malária (Porto Velho, Rondônia) e mostraram que a GLURP-R0 foi mais imunogênica (67%) quando comparada a MSP-3 (41%) (111,115).

Anticorpos IgG anti-Pfs48/45 foram pouco frequentes. Surpreendentemente, nos grupos CZS e ML, a resposta induzida na infecção natural pela Pfs48/45 nos grupos CZS e ML foi predominantemente IgM e IgE. No grupo GJ, a frequência de anticorpos anti-Pfs48/45 foi baixa. A diferença na frequência de anticorpos anti-Pfs48/45 pode ser devido a diferença no grau de transmissão de malária entre as áreas estudadas, visto que trabalhos já demonstraram que a resposta anticorpo anti-Pfs48/45 varia de acordo com a transmissão (162).

Anticorpos naturalmente adquiridos contra vários antígenos plasmodiais estão associados com idade e tempo de exposição à malária em regiões endêmicas, um fenômeno que tem sido frequentemente relatado para vários antígenos (111,156,159,163–170). No presente trabalho, os níveis de IgG contra a GMZ2.6c (no grupo ML), contra a GLURP (grupos ML e GJ) e contra a Pfs48/45 (no grupo GJ) aumentaram com idade e tempo de residência em área endêmica de malária, provavelmente refletindo a exposição natural ao *P. falciparum* e, possivelmente, a maturação do sistema imune. Curiosamente, apenas no grupo ML, foi observada uma correlação entre anticorpos IgG anti-GLURP e número de infecções anteriores de malária. Nos grupos CZS e GJ nenhuma correlação com número de infecções foi observada. Pelo menos três hipóteses podem ser evocadas para explicar esse resultado. A primeira baseia-se no fato de que o dado do número de infecções anteriores de malária pode estar sendo subestimado devido à dificuldade dos indivíduos terem a exata lembrança de números de episódios anteriores desde a

infância. A segunda hipótese baseia-se no fato de que os indivíduos que residem há vários anos em área endêmica de malária podem ter desenvolvido um certo grau de imunidade antimalárica, após terem apresentado vários episódios de malária, relatando, assim, menos episódios de malária clínica. Recentes trabalhos Tem relatado um considerável número de infecções oligo e assintomáticas entre indivíduos com grande tempo de exposição (18 anos em média), que vivem em áreas hipoendêmicas de transmissão instável do Brasil (171,172). A terceira hipótese baseia-se no fato de que devido a alta frequência de *P. vivax* em relação a *P. falciparum* na área, o número de infecções anteriores de malária não significa necessariamente a estimulação de uma resposta imune para a antígenos específicos de *P. falciparum*.

A análise das frequências de indivíduos e dos níveis de anticorpos IgG e IgM contra as proteínas GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 não forneceu evidências sobre um possível papel protetor desses anticorpos pois nenhuma relação entre a frequência ou os níveis desses anticorpos e a presença ou ausência de parasitas no sangue, a presença ou ausência de sintomas no momento da coleta ou os níveis de parasitemia foi observada. Esses dados corroboram os descritos na literatura que demonstram que a alta frequência de anticorpos antiplasmodiais IgG e/ou IgM numa população não reflete necessariamente o grau de proteção dessa população (173,174). A falta de associação entre os níveis de anticorpos IgG e IgM e a redução da parasitemia e/ou sintomatologia também pode ser explicada pelos baixos níveis de transmissão observados nas áreas estudadas no período da coleta.

Em algumas infecções como, por exemplo, na toxoplasmose, a detecção de anticorpos da classe IgM representa um importante marcador no diagnóstico da doença, uma vez que a presença desses anticorpos pode ser utilizada para diferenciar uma infecção atual ou recente de uma infecção passada. A detecção de anticorpos IgM-GMZ2.6c, -GLURP-R0, -MSP-3 ou -Pfs48/45 poderia sugerir uma infecção atual ou recente de malária. Entretanto, nenhuma relação foi observada entre anticorpos IgM-GMZ2.6c, -GLURP-R0, -MSP-3 ou -Pfs48/45 e infecção atual ou data da última infecção. Esses dados são semelhantes aos descritos por Balthazar-Guedes e colaboradores que demonstraram que, na malária, a resposta IgM não pode ser utilizada como indicadora de infecção atual ou recente (175).

Anticorpos IgE podem proteger contra ou participar na patogênese da malária (176–182). Entretanto, o papel da IgE na infecção malárica permanece incerto. Assim, nosso trabalho também avaliou a frequência e os níveis de anticorpos IgE contra a GMZ2.6c, a GLURP, a MSP-3 e a Pfs48/45 nos indivíduos dos grupos CZS, ML e GJ. A frequência e os níveis de anticorpos IgE contra a GMZ2.6c foi baixa em nos 3 grupos estudados, CZS (8,9%), ML(2,3%) e GJ (2,3%). Entretanto, para os componentes individuais, verificamos uma maior frequência de anticorpos IgE contra a GLURP (19,4%) e a Pfs48/45 (19,4%), no grupo CZS. Uma explicação é que anofelinos circulantes em Cruzeiro do Sul estejam influenciando essa maior frequência de IgE visto que trabalhos relataram que os títulos individuais de IgE anti-glândula salivar do anofelino esta positivamente correlacionada com os títulos de IgE antiplasmodiais, consistente com a hipótese que a picada do anofelino predispõe os indivíduos ao desenvolvimento de uma resposta IgE antiplasmodial (183).

Considerando que (i) indivíduos protegidos da malária clínica possuem altos níveis de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) contra antígenos plasmodiais; (ii) quanto maior o grau de proteção desses indivíduos, maior é a razão entre anticorpos citofílicos e não citofílicos (IgG2 e IgG4) e; (iii) anticorpos não citofílicos podem bloquear o mecanismo efetor dos anticorpos citofílicos (109,133,134,184–188), avaliamos a qualidade da resposta anticorpo contra as proteínas GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 pela análise das subclasses de IgG. A pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi realizada em todas as amostras que apresentaram anticorpos IgG para cada uma das proteínas estudadas. Anticorpos das 4 subclasses foram detectados no plasma dos indivíduos dos grupos CZS, ML e GJ.

Nossos dados mostraram que indivíduos naturalmente expostos à infecção malárica apresentam predominantemente anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) que reconhecem a GMZ2.6c, fato importante se considerarmos que a aquisição de uma imunidade protetora contra a malária está associada com a presença e altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 e reduzida proporção de IgG2 e IgG4 com a mesma especificidade visto que anticorpos não citofílicos bloqueiam os mecanismos efetores (106,186,189). A interação entre a anticorpos citofílicos e receptores Fc (FcR) em células fagocíticas pode levar a ativação celular e desencadear funções efetoras tais como fagocitose, produção de citocinas e quimiocinas, citotoxicidade e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (190). Anticorpos citofílicos

podem mediar a morte do parasito em cooperação com células mononucleares através do mecanismo de inibição celular dependente de anticorpo (ADCI) além da opsonização de merozoítas de *P. falciparum* (78,95,188).

Estudos tem demonstrado que as características inerentes aos antígenos plasmodiais influenciam nos eventos moleculares que levam à indução preferencial de diferentes subclasses de IgG. A presença de sequências de aminoácidos que são simultaneamente repetitivas e polimórficas induz uma resposta predominantemente IgG3, enquanto que a ausência dessas repetições polimórficas induz predominantemente uma resposta IgG1. Antígenos polimórficos sem sequência repetitiva induzem uma resposta IgG1+IgG3, com a predominância de IgG3 enquanto que antígenos repetitivos conservados induzem uma resposta IgG1 ou IgG1+IgG3 (191,192). Nossos dados mostraram que GLURP-R0 em indivíduos naturalmente expostos à infecção malárica induz uma resposta anticorpo predominantemente citofílica (IgG1 + IgG3), especialmente no grupo CZS, enquanto que a MSP-3 induziu uma resposta predominantemente IgG1, nos 3 grupos estudados. Esses resultados podem ser devido à característica não repetitiva conservada da GLURP-R0 contrastando com a natureza repetitiva e relativamente mais polimórfica da MSP-3 (137,140,193). Entretanto, fatores como a cumulativa exposição à malária, a idade dos indivíduos, o HLA e o polimorfismo dos receptores FC γ R tem mostrado influenciar a distribuição das subclasses de IgG contra antígenos plasmodiais (191,194). Além disso, combinações específicas de citocinas e ativadores de células B tem mostrado induzir o *switch* para certas classes e subclasses em modelos experimentais (195). Experimentos *in vitro* com células B humanas e murinas tem identificado citocinas que induzem seletivamente a síntese de uma particular classe de imunoglobulina pela estimulação do rearranjo do DNA e transcrição seletiva de genes C_H (196–199).

Trabalhos realizados em área de alta endemicidade de malária tem demonstrado correlação entre os níveis de anticorpos citofílicos e a parasitemia (132,134,200). Porém, em nosso trabalho não verificamos nenhuma correlação entre os níveis de anticorpos IgG1 e/ou IgG3 e/ou a relação entre anticorpos citofílicos e não citofílicos (dados não mostrados) e a parasitemia. Dados similares foram obtidos por Maya e colaboradores que também não observaram correlação entre níveis de anticorpos citofílicos e parasitemia em um estudo realizado no Gabão (201). Um

recente estudo que avaliou a resposta imune contra antígenos de esporozoítas e dos estágios hepático e eritrocítico em área endêmica brasileira de malária (Porto Velho, Rondônia) também não observou relação entre níveis de anticorpos IgG1 ou IgG3 ou a relação entre anticorpos citofílicos /não citofílicos e a parasitemia (202). Uma possível explicação para esses resultados é o pequeno número de indivíduos parasitados por *P. falciparum* em nosso trabalho, apenas 25/124 indivíduos de CZS (20,2 %), 12/88 indivíduos de ML (13,6 %) e 6/87 indivíduos de GJ (6,7%). Além disso, dos 43 indivíduos parasitados com *P. falciparum*, em apenas 21 foi possível quantificar parasitos nas lâminas. Os 22 indivíduos restantes foram diagnosticados por métodos moleculares.

Nossos dados mostraram que os níveis de anticorpos IgG e IgM contra a GMZ2.6c, a GLURP e a MSP-3 foram maiores nos indivíduos parasitados quando comparado aos indivíduos não parasitados. Esse resultado pode ser reflexo de uma estimulação do sistema imune levando a produção de anticorpos antiplasmodiais, entre os quais anticorpos anti-GLURP e anti-MSP3, devido à infecção. Esse booster, em resposta à infecção, induziria uma resposta anticorpo predominantemente citofílica contra a GLURP (IgG1 e IgG3) e MSP-3 (IgG1).

O mapeamento epítomos B da GMZ2.6c foi realizado em todas as amostras que apresentaram anticorpos IgG para cada uma das proteínas recombinantes. Foram utilizados quatro peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes regiões da MSP-3 e 13 peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes regiões da GLURP-R0, descritos previamente como epítomos imunodominantes (106,151). Foram utilizados também dois peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes regiões da Pfs48/45 identificados a partir de análise de predição. Não observamos nenhuma associação entre o número de epítomos reconhecidos com idade, tempo de residência ou número de infecções anteriores de malária. Esses dados diferem dos previamente descritos que observaram uma associação entre o número de epítomos reconhecidos por anticorpos de indivíduos residentes em Rondônia e idade, tempo de residência em área endêmica e número de infecções anteriores de malária (111).

O mapeamento epitópico mostrou que os epítomos B imunodominantes da GMZ2.6c foram P3 e P11, da GLURP-R0. Não apenas a frequência foi maior, como também P3 e P11, na infecção natural, induziram maiores níveis de anticorpos IgG

nos grupos CZS, ML e GJ. P11 também foi identificado como o epítopo imunodominante da GLURP-R0 em um estudo realizado em Porto Velho, Rondônia (111). Vale ressaltar que a imunodominância do epítopo P11 também tem sido demonstrada em macacos *Saimiri* e *Aotus* imunizados com uma proteína híbrida contendo a região R0 da GLURP e a região C-terminal da MSP-3 (203). Um estudo publicado por Theisen e colaboradores relatou que os epítotos B imunodominantes da GLURP-R0 em indivíduos clinicamente imunes na Libéria foram P3 e P4. Além disso, nessa população, apenas 28% dos indivíduos estudados apresentavam anticorpos para o epítopo P11 (110). Duas hipóteses podem explicar as diferenças na imunodominância desses epítotos da GLURP entre as duas áreas estudadas. A primeira envolve diferenças genéticas na GLURP entre isolados das duas áreas. De fato, estudos prévios demonstraram a existência de um limitado polimorfismo na região R0 quando isolados de diferentes áreas geográficas (incluindo isolados brasileiros) foram comparados (125,174). A segunda hipótese envolve diferenças étnicas entre as duas populações estudadas. De fato, estudo prévio relatou que a resposta anticorpo anti-GLURP parece ser modulada pelos antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (111).

Os dados do mapeamento de epítotos B da GMZ2.6c também mostraram que o epítopo P4 foi imunodominante no grupo ML, enquanto que os epítotos da MSP3, Msp3a, Msp3c e DG210 foram amplamente reconhecidos por anticorpos presentes no plasma dos indivíduos do grupo CZS. Devido ao número reduzido de indivíduos com anticorpos para MSP-3 nos grupos ML e GJ e contra a Pfs48/45 nos grupos CZS, ML e GJ, não foi possível realizar análise estatística confiável.

Dos 43 indivíduos com diagnóstico positivo para *P. falciparum*, 20 tiveram amostras coletadas no dia do diagnóstico antes de início do tratamento (D0), e 15 dias após o início do tratamento (D15). A pesquisa de anticorpos IgG, IgM, IgA, IgE e a pesquisa das subclasses de IgG contra as proteínas GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 e a pesquisa de anticorpos IgG contra os epítotos da GMZ2.6c foi avaliada em D0 e D15. Não observamos diferença significativa na mudança do perfil respondedor ↔ não respondedor para GMZ2.6c, GLURP, MSP3, Pfs48/45 ou para os epítotos da GMZ2.6c. Entretanto, observamos maiores níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA contra a Pfs48/45 quando comparamos a segunda (D15) com a primeira coleta (D0). Esse resultado pode ser devido ao fato de que a terapia

antimalárica não é automaticamente acompanhada da diminuição do número de gametócitos circulantes (204). Contrariamente, trabalhos tem relatado que *P. falciparum* aumenta a diferenciação em gametócitos em resposta a terapia subcurativa (205). Mesmo após doses terapêuticas de antimaláricos, um aumento no número de gametócitos circulantes é observado (204). O aumento da gametocitemia após o tratamento parece ser resultado tanto de um efluxo de gametócitos sequestrados quanto da produção de gametócitos após o início do tratamento, provavelmente devido estresse induzido pela droga (204,205). O aumento do número de gametócitos pode acarretar em um efeito *booster*, aumentando os níveis de anticorpos.

Em conjunto, nossos dados mostraram que a proteína GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos de indivíduos residentes em Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul e Guajará e que esse amplo reconhecimento parece ser independente do nível de endemicidade da área. A maior frequência e níveis de anticorpos contra a GMZ2.6c quando comparado aos seus componentes individuais sugere o efeito sinérgico de GLURP-R0, MSP-3 e Pfs48/45. Entre os componentes individuais da GMZ2.6c, a GLURP se revelou a mais imunogênica na infecção natural. Além disso, a resposta anticorpo contra a GLURP e MSP-3 é predominantemente citofílica, IgG1 e/ou IgG3. Os epítomos B imunodominantes da GMZ2.6c preferencialmente reconhecidos pelos anticorpos de indivíduos das áreas endêmicas brasileiras estudadas são P3 e P11. Nossos dados ressaltam a importância da GMZ2.6c como uma candidata a vacina antimalárica. Entretanto, estudos adicionais em outras áreas endêmicas, com população com outros backgrounds genéticos, além da avaliação do papel funcional dos anticorpos anti- GMZ2.6c são importantes para confirmar o potencial da GMZ2.6c como vacina antimalárica.

7. CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos dados permitiram concluir que:

- A proteína GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos, principalmente da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG3.;
- O amplo reconhecimento da GMZ2.6c por anticorpos naturalmente adquiridos parece ser independente do nível de endemicidade da área;
- A maior frequência e níveis de anticorpos contra a GMZ2.6c quando comparado aos seus componentes individuais sugere o efeito sinérgico de GLURP-R0, MSP-3 e Pfs48/45.
- Entre os componentes individuais da GMZ2.6c, a proteína GLURP foi mais imunogênica;
- IgG1 e IgG3 contra a GLURP e MSP-3 foram as subclasses de IgG predominantes nas populações estudadas.
- Os epítomos B imunodominantes da GMZ2.6c preferencialmente reconhecidos pelos anticorpos de indivíduos das áreas endêmicas brasileiras estudadas são P3, P4 e P11.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pretendemos:

- Avaliar o perfil da resposta imune celular (ativação celular, populações linfocitárias, resposta proliferativa, perfil de citocinas) contra GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) nas populações estudadas.
- Identificar e validar os epítomos T imunodominantes da GMZ2.6c nas populações estudadas.
- Avaliar o papel funcional dos anticorpos anti-GMZ2.6c sobre o crescimento *in vitro* de *P. falciparum*, em presença e ausência de monócitos, e em ensaios de fagocitose.
- Estudar a associação entre os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classes I e II e as respostas imune celular e humoral contra as proteínas MSP-3, GLURP e Pfs48/45.
- Avaliar a extensão do polimorfismo genético das proteínas MSP-3, GLURP e Pfs48/45 e sua influência no desenvolvimento da resposta imune específica.

9. REFERÊNCIAS

1. Faust C, Dobson AP. Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic *Plasmodium*. *One Health*. 2015;66–75.
2. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz. 1994. 228p.
3. Mirabello L, Conn JE. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity*. 2006;96(4):311–21.
4. Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, et al. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*. 2004;116(5):661–70.
5. World Health Organization. World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malariareport-2016/report/en/>
6. Rahimi B, Thakkestian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, Chokejindachai W. Severe *vivax* malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malar J*. 2014;13(1):481.
7. Saravu K, Rishikesh K, Kamath A, Shastry AB. Severity in *Plasmodium vivax* malaria claiming global vigilance and exploration – a tertiary care centre-based cohort study. *Malar J*. 2014;13(1):304.
8. Demissie Y, Ketema T. Complicated malaria symptoms associated with *Plasmodium vivax* among patients visiting health facilities in Mendi town, Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):436.
9. Kumar R, Saravu K. Severe *vivax* malaria: a prospective exploration at a tertiary healthcare centre in Southwestern India. *Pathog Glob Health*. 2017 Apr 3;111((3)):148–60.
10. Pan American Health Organization/World Health Organization. Epidemiological Alert: Increase in cases of malaria. report. 2017;(February):2–7. Disponível em: <http://www.paho.org>
11. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Heal*. 2017;5.
12. Vigilância da malária no estado do Rio de Janeiro - Perfil epidemiológico - Anos 2016 a 2017. Rio de Janeiro: Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses, Secretaria de estado de saúde do Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br>
13. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resumo Epidemiológico por Local de Notificação [Internet]. DataSUS. 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>

14. Pribluda VS, Evans L, Barillas E, Marmion J, Lukulay P, Chang J. Were medicine quality and pharmaceutical management contributing factors in diminishing artemisinin efficacy in Guyana and Suriname? *Malar J*. 2014;13(1):77.
15. Acharya P, Garg M, Kumar P, Munjal A, Raja KD. Host-parasite interactions in human malaria: Clinical implications of basic research. *Front Microbiol*. 2017;8(may).
16. Thera MA, Plowe C V. Vaccines for Malaria: How Close Are We? *Annu Rev Med*. 2012;63(3):345–57.
17. Frischknecht F, Matuschewski K. *Plasmodium* sporozoite biology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 May 1;7(5):a025478.
18. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends Parasitol*. 2015;31(8):357–62.
19. Ancsin JB, Kisilevsky R. A Binding Site for Highly Sulfated Heparan Sulfate Is Identified in the N Terminus of the Circumsporozoite Protein. *J Biol Chem*. 2004 May 21;279(21):21824–32.
20. Tewari R, Rathore D, Crisanti A. Motility and infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites expressing avian *Plasmodium gallinaceum* circumsporozoite protein. *Cell Microbiol*. 2005 Mar 9;7(5):699–707.
21. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz J-FF, et al. Host Cell Traversal Is Important for Progression of the Malaria Parasite through the Dermis to the Liver. *Cell Host Microbe*. 2008;3(2):88–96.
22. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*. 2001;291(5501):141–4.
23. Mota MM, Giordano S, Rodriguez A. Targeting *Plasmodium* host cells: Survival within hepatocytes. *Trends Mol Med* 2004;10(10):487-92.
24. Mota MM, Hafalla JCR, Rodriguez A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med*. 2002 Nov 15;8(11):1318–22.
25. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. *Malaria: Biology and Disease*. Cell Press; 2016: (167):610–24.
26. Lima-Junior J da C, Pratt-Riccio LR. Major histocompatibility complex and malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. *Front Immunol*. 2016;(7):13.
27. Ouattara A, Laurens MB. Vaccines against malaria. *Clin Infect Dis*. 2015;60(6):930–6.
28. Holder A. Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion. *Parasitology*. 1994;108:S5-18.
29. Tham WH, Healer J, Cowman AF. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitol*. 2012;(28):23–30.

30. Satchwell TJ. Erythrocyte invasion receptors for *Plasmodium falciparum*: New and old. *Transfus Med*. 2016 Apr;26(2):77–88.
31. Chattopadhyay R, Kumar S. Malaria vaccine: Latest update and challenges ahead. *Indian J Exp Biol*. 2009;47(7):527–36.
32. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4168–78.
33. Meibalan E, Marti M. Biology of malaria transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Mar 1;7(3):a025452.
34. Saraiva RG, Kang S, Simões ML, Angleró-Rodríguez YI, Dimopoulos G. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Dev Comp Immunol*. 2016 Nov;64:53–64.
35. Talman AM, Prieto JH, Marques S, Ubaida-Mohien C, Lawniczak M, Wass MN, et al. Proteomic analysis of the *Plasmodium* male gamete reveals the key role for glycolysis in flagellar motility. *Malar J*. 2014 Aug 13;13(1):315.
36. Carter LM, Pollitt LC, Wilson LG, Reece SE. Ecological influences on the behaviour and fertility of malaria parasites. *Malar J*. 2016 Apr 18;15(1):220.
37. Kumar N. Modulation of transmission success of *Plasmodium falciparum* gametocytes (sexual stages) in various species of Anopheles by erythrocytic asexual stage parasites. *Acta Trop*. 2017;176:263–9.
38. Demanga CG, Eng JWL, Gardiner DL, Roth A, Butterworth A, Adams JH, et al. The development of sexual stage malaria gametocytes in a Wave Bioreactor. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):216.
39. Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria vaccine development: Persistent challenges. Vol. 24, *Curr Opin Immunol*. 2012;24(3):324–31.
40. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. Vol. 49, *Am J Prev Med*. 2015; 49(6):S319–33.
41. Miles A, Iqbal Z, Vauterin P, Pearson R, Campino S, Theron M, et al. Indels, structural variation, and recombination drive genomic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Genome*. 2016;26(9):1288–99.
42. Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria vaccine: Candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol*. 2002;56(4):327–43.
43. Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev*. 2004;201:268–90.
44. Matuschewski K. Vaccines against malaria - still a long way to go. *FEBS J*. 2017;1–9.
45. Schwartz L, Brown G V, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J*. 2012;11(1):11.

46. Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bull World Health Organ.* 1979;57(Suppl. 1):165–73.
47. David F. Clyde, Vincent C. McCarthy, Roger M. Miller WEW. Immunization of Man against *Falciparum* and *Vivax* Malaria by Use of Attenuated Sporozoites. *Am J Trop Med Hyg.* 1975 May 1;24(3):397–401.
48. Holder AA. Malaria vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1167–9.
49. Arévalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. *Hum Vaccin.* 2010 Jan 27;6(1):124–32.
50. Carter R. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine.* 2001; 19(17-19):2309–14.
51. Singh K, Mehta S. The clinical development process for a novel preventive vaccine: An overview. *J Postgrad Med.* 2016;62(1):4–11.
52. Guinovart C, Alonso PL. Methods for Determining Vaccine Efficacy and Effectiveness and the Main Barriers to Developing a Fully Deployable Malaria Vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77((6)):276–81.
53. Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature.* 1967 Oct 14;216(5111):160–2.
54. Lyke KE, Ishizuka AS, Berry AA, Chakravarty S, DeZure A, Enama ME, et al. Attenuated PfSPZ Vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(10):2711–6.
55. Lyke KE. Steady progress toward a malaria vaccine. *Curr Opin Infect Dis.* 2017.
56. Hoffman SL, Goh LML, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, et al. Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *J Infect Dis.* 2002 Apr 15;185(8):1155–64.
57. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJF, van Gemert GJ, et al. Protection against a Malaria Challenge by Sporozoite Inoculation. *N Engl J Med.* 2009 Jul 30;361(5):468–77.
58. Roestenberg M, Teirlinck AC, McCall MBB, Teelen K, Makamdop KN, Wiersma J, et al. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet.* 2011 May 21;377(9779):1770–6.
59. Seder RA, Chang L-J, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ, et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science.* 2013 Sep 20;341(6152):1359–65.

60. Ishizuka AS, Lyke KE, DeZure A, Berry AA, Richie TL, Mendoza FH, et al. Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. *Nat Med*. 2016 May 9;22(6):614–23.
61. Bojang KA, Milligan PJM, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, et al. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: A randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9297):1927–34.
62. Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner DG, Hall T, et al. A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults. *Vaccine*. 2007 Jul;25(29):5359–66.
63. Kester KE, Cummings JF, Ockenhouse CF, Nielsen R, Hall BT, Gordon DM, et al. Phase 2a trial of 0, 1, and 3 month and 0, 7, and 28 day immunization schedules of malaria vaccine RTS,S/AS02 in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*. 2008 Apr;26(18):2191–202.
64. Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, Ockenhouse CF, Krzych U, Moris P, et al. Randomized, double-blind, phase 2a trial of *falciparum* malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis*. 2009;200:337–46.
65. Sacarlal J, Aide P, Aponte JJ, Renom M, Leach A, Mandomando I, et al. Long-term safety and efficacy of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children. *J Infect Dis*. 2009;200(3):329–36.
66. RTSS Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of RTS,S / AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*. 2015 Jul;386(10015):31–45.
67. Bliss CM, Drammeh A, Bowyer G, Sanou GS, Jagne YJ, Ouedraogo O, et al. Viral Vector Malaria Vaccines Induce High-Level T Cell and Antibody Responses in West African Children and Infants. *Mol Ther*. 2017;25(2):547–59.
68. O'Hara GA, Duncan CJA, Ewer KJ, Collins KA, Elias SC, Halstead FD, et al. Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: A potent new vaccine vector. *J Infect Dis*. 2012;205(5):772–81.
69. Ogwang C, Afolabi M, Kimani D, Jagne YJ, Sheehy SH, Bliss CM, et al. Safety and Immunogenicity of Heterologous Prime-Boost Immunisation with *Plasmodium falciparum* Malaria Candidate Vaccines, ChAd63 ME-TRAP and MVA ME-TRAP, in Healthy Gambian and Kenyan Adults. *PLoS One*. 2013;8(3).
70. Kimani D, Jagne YJ, Cox M, Kimani E, Bliss CM, Gitau E, et al. Translating the immunogenicity of prime-boost immunisation with ChAd63 and MVA ME-TRAP from malaria naïve to malaria-endemic populations. *Mol Ther*. 2014;22:1992–2003.

71. Ogwang C, Kimani D, Edwards NJNJ, Roberts R, Mwacharo J, Bowyer G, et al. Prime-boost vaccination with chimpanzee adenovirus and modified vaccinia Ankara encoding TRAP provides partial protection against *Plasmodium falciparum* infection in Kenyan adults. *Sci Transl Med*. 2015;7(286):286re5.
72. Afolabi MO, Tiono AB, Adetifa UJ, Yaro JB, Drammeh A, Nebie I, et al. Safety and Immunogenicity of ChAd63 and MVA ME-TRAP in West African Children and Infants. *Mol Ther*. 2016;1–8.
73. Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, Corradin G, et al. Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infect Immun*. 2005 [cited 2017 Aug 7];73(12):8017–26.
74. Sirima SB, Nébié I, Ouédraogo A, Tiono AB, Konaté AT, Gansané A, et al. Safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 long synthetic peptide (MSP3-LSP) malaria vaccine in healthy, semi-immune adult males in Burkina Faso, West Africa. *Vaccine*. 2007 Mar 30;25(14):2723–32.
75. Sirima SB, Tiono AB, Ouédraogo A, Diarra A, Ouédraogo AL, Yaro JB, et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate MSP3 long synthetic peptide in 12-24 months-old Burkinabe children. *PLoS One*. 2009;4(10).
76. Lusingu JPA, Gesase S, Msham S, Francis F, Lemnge M, Seth M, et al. Satisfactory safety and immunogenicity of MSP3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12-24 months. *Malar J*. 2009;8:163.
77. Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, et al. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. Greenwood B, editor. *PLoS Med*. 2005 Nov 8;2(11):1135–44.
78. Theisen M, Adu B, Mordmüller B, Singh S. The GMZ2 malaria vaccine: from concept to efficacy in humans. *Expert Rev Vaccines*. 2017 Jul 21;1–11.
79. Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, Gässler M, Imoukhuede EB, Imbault N, et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2009 Nov;27(49):6862–8.
80. Mordmüller B, Szywon K, Greutelaers B, Esen M, Mewono L, Treut C, et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambaréné, Gabon. *Vaccine*. 2010;28(41):6698–703.
81. Bélard S, Issifou S, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, Esen M, et al. A randomized controlled phase IB trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in african children. *PLoS One*. 2011;6(7):1–8.
82. Jepsen MPG, Jogdand PS, Singh SK, Esen M, Christiansen M, Issifou S, et al. The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas. *J Infect Dis*. 2013;208(3):479–88.

83. Sirima SB, Mordmuller B, Milligan P, Ngoa UA, Kironde F, Atuguba F, et al. A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. *Vaccine*. 2016 Aug;34(38):4536–42.
84. Mamo H, Esen M, Ajua A, Theisen M, Mordmüller B, Petros B. Humoral immune response to *Plasmodium falciparum* vaccine candidate GMZ2 and its components in populations naturally exposed to seasonal malaria in Ethiopia. *Malar J*. 2013;12:51.
85. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Tiono AB, Konate AT, Gansane A, et al. Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso. *Parasite Immunol*. 2009;31(8):474–80.
86. Bergmann-Leitner ES, Mease RM, de la Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, Ockenhouse C, et al. Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from *Plasmodium falciparum* elicits cross-species protection against heterologous challenge with *Plasmodium berghei*. *PLoS One*. 2010;5(8).
87. Horii T, Shirai H, Jie L, Ishii KJ, Palacpac NQ, Tougan T, et al. Evidences of protection against blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36. *Parasitol Int*. 2010;59(3):380–6.
88. Palacpac NMQ, Ntege E, Yeka A, Balikagala B, Suzuki N, Shirai H, et al. Phase 1b Randomized Trial and Follow-Up Study in Uganda of the Blood-Stage Malaria Vaccine Candidate BK-SE36. *PLoS One*. 2013;8(5).
89. De Barra E, Hodgson SH, Ewer KJ, Bliss CM, Hennigan K, Collins A, et al. A phase Ia study to assess the safety and immunogenicity of new malaria vaccine candidates ChAd63 CS administered alone and with MVA CS. *PLoS One*. 2014;9(12).
90. de Cassan SC, Rushdi Shakri A, Llewellyn D, Elias SC, Cho JS, Goodman AL, et al. Preclinical assessment of viral vectored and protein vaccines targeting the Duffy-binding protein region II of *Plasmodium vivax*. *Front Immunol*. 2015;6.
91. Li Y, Leneghan DB, Miura K, Nikolaeva D, Brian IJ, Dicks MDJ, et al. Enhancing immunogenicity and transmission-blocking activity of malaria vaccines by fusing Pfs25 to IMX313 multimerization technology. *Sci Rep*. 2016;6:18848.
92. Espinosa DA, Vega-Rodriguez J, Flores-Garcia Y, Noe AR, Muñoz C, Coleman R, et al. The *Plasmodium falciparum* Cell- Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites as a Candidate for Preerythrocytic and Transmission- Blocking Vaccines. *Infect Immun*. 2017;85(2):1–10.
93. Payne RO, Silk SE, Elias SC, Milne KH, Rawlinson TA, Llewellyn D, et al. Human vaccination against *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. *J Immunoass Immunochem*. 2017 Jun 15;33(1):1–17.
94. Reed ZH, Friede M, Kieny MP. Malaria vaccine development: progress and challenges. *Curr Mol Med*. 2006 Mar 1;6(2):231–45.

95. Druilhe P, Pérignon JL. Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans. *Immunol Lett.* 1994 Jul [cited 2017 Aug 25];41(2–3):115–20.
96. Teo A, Feng G, Brown G V, Beeson JG, Rogerson SJ. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. Vol. 32, *Trends in Parasitology.* 2016: (32):887–98.
97. Persson KEM, Fowkes FJI, McCallum FJ, Gicheru N, Reiling L, Richards JS, et al. Erythrocyte-Binding Antigens of *Plasmodium falciparum* Are Targets of Human Inhibitory Antibodies and Function To Evade Naturally Acquired Immunity. *J Immunol.* 2013 Jul 15;191(2):785–94.
98. 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 Microbiol Rev.* 2016;(40):343–72.
99. Hill DL, Eriksson EM, Li Wai Suen CSN, Chiu CY, Ryg-Cornejo V, Robinson LJ, et al. Opsonising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. *PLoS One.* 2013;8(9):e74627.
100. Osier FH, Feng G, Boyle MJ, Langer C, Zhou J, Richards JS, et al. Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med.* 2014 Jul 1;12(1):108.
101. Joos C, Marrama L, Polson HEJ, Corre S, Diatta AM, Diouf B, et al. Clinical protection from *falciparum* malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. Beeson JG, editor. *PLoS One.* 2010 Mar 25;5(3):e9871.
102. Boyle MJ, Reiling L, Feng G, Langer C, Osier FH, Aspeling-Jones H, et al. Human antibodies fix complement to inhibit *plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. *Immunity.* 2015 Mar 17;42(3):580–90.
103. Raj DK, Nixon CP, Nixon CE, Dvorin JD, DiPetrillo CG, Pond-Tor S, et al. Antibodies to PfSEA-1 block parasite egress from RBCs and protect against malaria infection. *Science.* 2014 May 23;344(6186):871–7.
104. Graves PM, Carters R, Burkot TR, Quakyl IA, Kumar N. Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunol.* 1988;10(2):209–18.
105. Ong SL, Zhang KY, Eida SJ, Graves PM, Dow C, Looker M, et al. The primary antibody response of malaria patients to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens which are potential transmission blocking vaccine candidates. *Parasite Immunol.* 1990;12(4–5):447–56.
106. Oeuvray BC, Bouharoun-tayoun H, Gras-masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, et al. Merozoite Surface Protein-3: A Malaria Protein Inducing Antibodies That Promote. *Blood.* 1994;84(5):1594–603.

107. Roeffen W, Mulder B, Teelen K, Bolmer M, Eling W, Targett GA, et al. Association between anti-Pfs48/45 reactivity and *P. falciparum* transmission-blocking activity in sera from Cameroon. *Parasite Immunol.* 1996 Feb;18(2):103–9.
108. Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, Danielsen S, et al. The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *Infect Immun.* 1998;66(1):11–7.
109. Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect Immun.* 2000;68(5):2617–20.
110. Theisen M, Soe S, Jessing SG, Okkels LM, Danielsen S, Oeuvray C, et al. Identification of a major B-cell epitope of the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing. *Vaccine.* 2000 Sep;19(2–3):204–12.
111. Pratt-Riccio LR, Lima JC, Carvalho LJM, Theisen M, Espíndola-Mendes EC, Santos F, et al. Antibody response profiles induced by *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein in naturally exposed individuals from a Brazilian area endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(6):1096–103.
112. Bousema JT, Roeffen W, Van Der Kolk M, De Vlas SJ, Van De Vegte-Bolmer M, Bangs MJ, et al. Rapid onset of transmission-reducing antibodies in Javanese migrants exposed to malaria in Papua, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(3):425–31.
113. Drakeley CJ, Bousema JT, Akim NIJ, Teelen K, Roeffen W, Lensen AH, et al. Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunol.* 2006;28(5):185–90.
114. Bousema JT, Drakeley CJ, Kihonda J, Hendriks JCM, Akim NIJ, Roeffen W, et al. A longitudinal study of immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens in Tanzanian adults. *Parasite Immunol.* 2007;29(6):309–17.
115. Pratt-Riccio LR, Bianco-Junior C, Totino PRR, Perce-da-Silva D de S, Silva LA, Riccio EKP, et al. Antibodies against the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein from naturally exposed individuals living in a Brazilian malaria-endemic area can inhibit in vitro parasite growth. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(SUPPL. 1):34–43.
116. Baumann A, Magris MM, Urbaez M-L, Vivas-Martinez S, Durán R, Nieves T, et al. Naturally acquired immune responses to malaria vaccine candidate antigens MSP3 and GLURP in Guahibo and Piaroa indigenous communities of the Venezuelan Amazon. *Malar J.* 2012;11(1):46.
117. Baldwin SL, Roeffen W, Singh SK, Tiendrebeogo RW, Christiansen M, Beebe E, et al. Synthetic TLR4 agonists enhance functional antibodies and CD4+ T-cell responses against the *Plasmodium falciparum* GMZ2.6C multi-stage vaccine antigen. *Vaccine.* 2016 Apr;34(19):2207–15.

118. Borre MB, Dziegiel M, Høgh B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, et al. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;49(1):119–31.
119. M. Dziegiel, M. B. Borre, S. Jepsen, B. Høgh, E. Petersen JV. Recombinant *Plasmodium Falciparum* Glutamate Rich Protein; Purification and use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Mar 1;44(3):306–13.
120. Theisen M, Cox G, Høgh B, Jepsen S, Vuust J. Immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein expressed by vaccinia virus. *Infect Immun.* 1994;62(8):3270–5.
121. Duru KC, Thomas BN. Genetic Diversity and Allelic Frequency of Glutamate-Rich Protein (GLURP) in *Plasmodium falciparum* Isolates from Sub-Saharan Africa. *Microbiol insights .* 2014 Nov;7:35–9.
122. Ranjit MR, Das A, Das BP, Das BN, Dash BP, Chhotray GP. Distribution of *Plasmodium falciparum* genotypes in clinically mild and severe malaria cases in Orissa, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005 May;99(5):389–95.
123. A-Elbasit IE, A-Elgadir TME, ElGhazali G, Elbashir MI, Giha HA. Genetic fingerprints of parasites causing severe malaria in a setting of low transmission in Sudan. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007 Aug 16;13(1–3):89–95.
124. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck H-P, Snounou G, et al. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2011;10(1):79.
125. Pratt-Riccio LR, Perce-da-Silva D de S, Lima-Junior J da C, Theisen M, Santos F, Daniel-Ribeiro CT, et al. Genetic polymorphisms in the glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* field isolates from a malaria-endemic area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Jun;108(4):523–8.
126. Kumar D, Dhiman S, Rabha B, Goswami D, Deka M, Singh L, et al. Genetic polymorphism and amino acid sequence variation in *Plasmodium falciparum* GLURP R2 repeat region in Assam, India, at an interval of five years. *Malar J.* 2014;13(1):450.
127. Dziegiel M, Rowe P, Bennett S, Allen SJ, Olerup O, Gottschau A, et al. Immunoglobulin M and G antibody responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein: Correlation with clinical immunity in Gambian children. *Infect Immun.* 1993;61(1):103–8.
128. Kana IH, Adu B, Tiendrebeogo RW, Singh SK, Dodoo D, Theisen M. Naturally acquired antibodies target the glutamate-rich protein on intact merozoites and predict protection against febrile malaria. *J Infect Dis.* 2017 Feb 15;215(4):623–30.
129. Høgh B, Petersen E, Dziegiel M, David K, Hanson A, Borre M, et al. Antibodies to a recombinant glutamate-rich *Plasmodium falciparum* protein: Evidence for

- protection of individuals living in a holoendemic area of Liberia. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 Mar;46(3):307–13.
130. Meraldi V, Nebié I, Tiono AB, Diallo D, Sanogo E, Theisen M, et al. Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* Exp-1, MSP-3 and GLURP long synthetic peptides and association with protection. *Parasite Immunol.* 2004 Jun;26(6–7):265–72.
 131. Hermsen CC, Verhage DF, Telgt DSC, Teelen K, Bousema JT, Roestenberg M, et al. Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit in vitro growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine.* 2007 Apr;25(15):2930–40.
 132. Doodoo D, Theisen M, Kurtzhals J a, Akanmori BD, Koram KA, Jepsen S, et al. Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 2000;181(3):1202–5.
 133. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Khin-Saw-Aye, Druilhe P. Association between Protection against Clinical Malaria and Antibodies to Merozoite Surface Antigens in an Area of Hyperendemicity in Myanmar: Complementarity between Responses to Merozoite Surface Protein 3 and the 220-Kilodalton Glutamate-Rich Protein. *Infect Immun.* 2004;72(1):247–52.
 134. Lusingu JPA, Vestergaard LS, Alifrangis M, Mmbando BP, Theisen M, Kitua AY, et al. Cytophilic antibodies to *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein are associated with malaria protection in an area of holoendemic transmission. *Malar J.* 2005;4:48.
 135. Theisen M, Vuust J, Gottschau A, Jepsen S, Høgh B. Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;2(1):30–4.
 136. McColl DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Mol Biochem Parasitol.* 1997;90(1):21–31.
 137. Huber W, Felger I, Matile H, Joachim Lipps H, Steiger S, Beck H-P. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. *Mol Biochem Parasitol.* 1997 Aug;87(2):231–4.
 138. Polley SD, Tetteh KKA, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA, et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect Dis.* 2007;195(2):279–87.
 139. Sawaswong V, Simpalipan P, Siripoon N, Harnyuttanakorn P, Pattaradilokrat S. Allelic Diversity and Geographical Distribution of the Gene Encoding *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-3 in Thailand. *Korean J Parasitol.* 2015;53(2):177–87.
 140. Pattaradilokrat S, Sawaswong V, Simpalipan P, Kaewthamasorn M, Siripoon N,

- Harnyuttanakorn P. Genetic diversity of the merozoite surface protein-3 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Malar J.* 2016;15(1):517.
141. Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, et al. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med.* 2005;2(11):1135–44.
 142. Van Dijk MR, Janse CJ, Thompson J, Waters AP, Braks JAM, Dodemont HJ, et al. A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell.* 2001;104(1):153–64.
 143. Theisen M, Jore MM, Sauerwein R. Towards clinical development of a Pfs48/45-based transmission blocking malaria vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2017 Apr 3;16(4):1–8.
 144. Outchkourov NS, Roeffen W, Kaan A, Jansen J, Luty A, Schuiffel D, et al. Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(11):4301–5.
 145. Chowdhury DR, Angov E, Kariuki T, Kumar N. A potent malaria transmission blocking vaccine based on codon harmonized full length Pfs48/45 expressed in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2009;4(7).
 146. Arredondo SA, Kappe SHI. The s48/45 six-cysteine proteins: mediators of interaction throughout the *Plasmodium* life cycle. *Intern J Parasitol.* 2017;(47): 409–23.
 147. Outchkourov N, Vermunt A, Jansen J, Kaan A, Roeffen W, Teelen K, et al. Epitope analysis of the malaria surface antigen Pfs48/45 identifies a subdomain that elicits transmission blocking antibodies. *J Biol Chem.* 2007;282(23):17148–56.
 148. Ouédraogo AL, Roeffen W, Luty AJF, de Vlas SJ, Nebie I, Ilboudo-Sanogo E, et al. Naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs48/45 and Pfs230 in an area of seasonal transmission. *Infect Immun.* 2011;79(12):4957–64.
 149. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria. *Nature.* 1961 Nov 25;192(4804):733–7.
 150. Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol Biol.* 1996;50:263–91.
 151. Theisen M, Dodo D, Toure-Balde A, Soe S, Corradin G, Koram KK, et al. Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity. *Infect Immun.* 2001 Sep 1;69(9):5223–9.
 152. Singh B, Cabrera-Mora M, Jiang J, Moreno A. A hybrid multistage protein vaccine induces protective immunity against murine malaria. *Infect Immun.* 2012;80(4):1491–501.
 153. Curtidor H, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Recent advances in the development

- of a chemically synthesised anti-malarial vaccine. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Nov 2;15(11):1567–81.
154. Baar M, McGregor IA. Diphtheria antitoxin levels in the serum of Gambian Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1962 Sep;56:368–70.
 155. Ho M, Webster HK, Looareesuwan S, Supanaranond W, Phillips RE, Chanthavanich P, et al. Antigen-Specific Immunosuppression in Human Malaria Due to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis.* 1986 Apr 1;153(4):763–71.
 156. Nebie I, Tiono AB, Diallo DA, Samandoulougou S, Diarra A, Konate AT, et al. Do antibody responses to malaria vaccine candidates influenced by the level of malaria transmission protect from malaria? *Trop Med Int Heal.* 2008 Feb 26;13(2):229–37.
 157. Courtin D, Oesterholt M, Huismans H, Kusi K, Milet J, Badaut C, et al. The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One.* 2009;4(10).
 158. Amoah LE, Nuvor S V, Obboh EK, Acquah FK, Asare K, Singh SK, et al. Natural antibody responses to *Plasmodium falciparum* MSP3 and GLURP(R0) antigens are associated with low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana. *Parasit Vectors.* 2017 Aug 23;10(1):395.
 159. Banic DM, Goldberg AC, Pratt-Riccio LR, De Oliveira-Ferreira J, Santos F, Gras-Masse H, et al. Human leukocyte antigen class II control of the immune response to p126-derived amino terminal peptide from *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 May;66(5):509–15.
 160. Sarr JB, Samb B, Sagna AB, Fortin S, Doucoure S, Sow C, et al. Differential acquisition of human antibody responses to *Plasmodium falciparum* according to intensity of exposure to *Anopheles* bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Aug;106(8):460–7.
 161. Carter R, Graves PM, Quakyi IA, Good MF. Restricted or absent immune responses in human populations to *Plasmodium falciparum* gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. *J Exp Med.* 1989;169(1):135–47.
 162. Skinner J, Huang C-Y, Waisberg M, Felgner PL, Doumbo OK, Ongoiba A, et al. *Plasmodium falciparum* Gametocyte-Specific Antibody Profiling Reveals Boosting through Natural Infection and Identifies Potential Markers of Gametocyte Exposure. *Infect Immun.* 2015;(83):4229-4236.
 163. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, et al. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):765–9.
 164. Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, et al. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the

- merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Feb;58(2):211–9.
165. Banic DM, De Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Conseil V, Gonçalves D, Fialho RR, et al. Immune response and lack of immune response to *Plasmodium falciparum* p126 antigen and its amino-terminal repeat in malaria-infected humans. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Jun;58(6):768–74.
 166. Roussilhon C, Oeuvray C, Müller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape J-F, et al. Long-term clinical protection from *falciparum* malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. Krishna S, editor. *PLoS Med.* 2007 Nov 13;4(11):e320.
 167. John CC, Tande AJ, Moormann AM, Sumba PO, Lanar DE, Min XM, et al. Antibodies to pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children. *J Infect Dis.* 2008 Feb 15;197(4):519–26.
 168. Osier FHA, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KKA, et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* 2008 May 1;76(5):2240–8.
 169. Riley EM, Olerup O, Bennett S, Rowe P, Allen SJ, Blackman MJ, et al. MHC and malaria: the relationship between HLA class II alleles and immune responses to *Plasmodium falciparum*. *Int Immunol.* 1992;4(9):1055–63.
 170. al-Yaman F, Genton B, Anders RF, Falk M, Triglia T, Lewis D, et al. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Nov;51(5):593–602.
 171. de Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin Infect Dis.* 1995 Feb;20(2):475.
 172. Mendonça VR, Souza LC, Garcia GC, Magalhães BM, Lacerda MV, Andrade BB, et al. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with clinical outcomes of patients with *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2014 Jul 19;13(1):278.
 173. Druilhe P, Khusmith S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. *Infect Immun.* 1987;55(4):888–91.
 174. Marsh SGE, Bodmer JG. HLA-DR and -DQ epitopes and monoclonal antibody specificity. *Immunol Today.* 1989 Sep;10(9):305–12.
 175. Balthazar-Guedes HC, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT. Prevalence of antibodies to potential malaria vaccine antigens in an endemic area of the State of Rondonia (Brazil). *Mem do Inst Oswaldo Cruz.* 1995;90(4):511–2.
 176. Perlmann H, Helmbj H, Hagstedt M, Carlson J, Larsson PH, Troye-Blomberg

- M, et al. IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria. Clin Exp Immunol. 1994;97:284–92.
177. Perlmann P, Perlmann H, Flyg BW, Hagstedt M, Elghazali G, Worku S, et al. Immunoglobulin E, a pathogenic factor in *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Immun. 1997;65(1):116–21.
 178. Perlmann P, Perlmann H, Looareesuwan S, Krudsood S, Kano S, Matsumoto Y, et al. Contrasting functions of IgG and IgE antimalarial antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. Am J Trop Med Hyg. 2000 Mar;62(3):373–7.
 179. Seka-Seka J, Brouh Y, Yapo-Crézoit AC, Atseye NH. The Role of Serum Immunoglobulin e in the Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* Malaria in Ivorian Children. Scand J Immunol. 2004 Feb 1;59(2):228–30.
 180. Berezky S, Montgomery SM, Troye-Blomberg M, Rooth I, Shaw MA, Färnert A. Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria. Int J Parasitol. 2004 Jul;34(8):935–42.
 181. Farouk SE, Dolo A, Berezky S, Kouriba B, Maiga B, Färnert A, et al. Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. Microbes Infect. 2005 Jan;7(1):110–7.
 182. Kumsiri R, Troye-Blomberg M, Pattanapanyasat K, Krudsood S, Maneerat Y. IgE low affinity receptor (CD23) expression, *Plasmodium falciparum* specific IgE and tumor necrosis factor-alpha production in Thai uncomplicated and severe *falciparum* malaria patients. Acta Trop. 2016 Feb;154:25–33.
 183. Lawaly R, Konate L, Marrama L, Dia I, Diallo D, Sarr FD, et al. Impact of Mosquito Bites on Asexual Parasite Density and Gametocyte Prevalence in Asymptomatic Chronic *Plasmodium falciparum* Infections and Correlation with IgE and IgG Titers. Infect Immun. 2012;80:2240–6.
 184. Groux H, Gysin J. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. Res Immunol. 1990;141(6):529–42.
 185. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87 Suppl 3:229–34.
 186. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* Malaria: Evidence for an Isotype Imbalance Which May Be Responsible for Delayed Acquisition of Protective Immunity. Infect Immun. 1992;1473–81.
 187. Beck HP, Felger I, Genton B, Alexander N, Al-Yaman F, Anders RF, et al. Humoral and cell-mediated immunity to the *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen in an adult population exposed to highly endemic malaria. Infect Immun. 1995;63(2):596–600.

188. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 1995;182(2):409–18.
189. Metzger WG, Okenu DMN, Cavanagh DR, Robinson J V., Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol*. 2003 Jun 1;25(6):307–12.
190. Ortega E, Soto-Cruz I. Early biochemical events in leukocyte activation through receptors for IgG. *Signal Transduction*. 2007;(7):415–26.
191. Scopel KKG, Fontes CJF, Ferreira MU, Braga Erika M. Factors associated with immunoglobulin G subclass polarization in naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins: A cross-sectional survey in Brazilian Amazonia. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(7):810–3.
192. Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SLR, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WMM, et al. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect Immun*. 2006;74(1):257–64.
193. McColl DJ, Silva A, Foley M, Kun JF, Favaloro JM, Thompson JK, et al. Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Nov;68(1):53–67.
194. Aucan C, Traoré Y, Fumoux F, Rihet P. Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Burkina Faso. *Infect Immun*. 2001;69(2):996–1001.
195. Coffman RL, Leberman DA, Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol*. 1993;54:229–70.
196. Isakson BYPC, Vitetta ES. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *J Exp Med*. 1982;155(3):734–48.
197. Snapper CM, Finkelman FD. Rapid loss of IgM expression by normal murine B cells undergoing IgG1 and IgE class switching after in vivo immunization. *J Immunol*. 1990 Dec 1;145(11):3654–60.
198. Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol*. 1996 (8):199–205.
199. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular Mechanism of Class Switch Recombination: Linkage with Somatic Hypermutation. *Annu Rev Immunol*. 2002 Apr;20(1):165–96.
200. Hogh B, Marbiah NT, Petersen E, Dolopaye E, Willcox M, Björkman A, et al. Classification of clinical *falciparum* malaria and its use for the evaluation of chemosuppression in children under six years of age in Liberia, West Africa. *Acta Trop*. 1993 Aug;54(2):105–15.
201. Maya DW, Mavoungou E, Deloron P, Theisen M, Ntoumi F. Distribution of IgG subclass antibodies specific for *Plasmodium falciparum* glutamate-rich-protein

- molecule in sickle cell trait children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol.* 2006 Feb;112(2):92–8.
202. Pratt-Riccio LR, Perce-da-Silva DS, Lima-Junior JC, Riccio EK, Ribeiro-Alves M, Santos F, et al. Synthetic antigens derived from *Plasmodium falciparum* sporozoite, liver and blood stages: naturally acquired immune response and HLA associations in individuals living in a brazilian endemic area. *Am J Trop Med Hyg*, No prelo.
203. Carvalho LJM, Alves FA, Bianco C, Oliveira SG, Zanini GM, Soe S, et al. Immunization of Saimiri sciureus monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(2):242–8.
204. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* 2011;(24):377–410.
205. Buckling A, Ranford-Cartwright LC, Miles A, Read AF. Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis in vitro. *Parasitol.* 1999 Apr;118 (4):339–46.

ANEXOS

ANEXO I – PARECER COMITE DE ETICA



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da resposta imunológica contra proteínas que são candidatas a vacina contra a malária.

Pesquisador: LILIAN ROSE PRATT RICCIO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 46084015.1.0000.5248

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-RJ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.420.846

Apresentação do Projeto:

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. São cinco as espécies de *Plasmodium* que parasitam naturalmente o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, e *P. knowlesi*, parasito simiano, porém recentemente descrito como causador de infecções entre humanos (White, 2008). Os vetores de *Plasmodium* sp. são as fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo o *An. darlingi* a principal espécie transmissora da malária no Brasil (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Mirabello et. al, 1998; Blandin et. al, 2004). A malária é uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo. Estima-se que 3,3 bilhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença. Em 2013, foram registrados 198 milhões de casos e 584 mil mortes por malária, em sua grande maioria (78%) crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2014).

Nas Américas a transmissão da malária ocorre em 21 países sendo que o Brasil é responsável por mais de 50% dos casos registrados. No ano de 2012 foram notificados 243 mil casos de malária no Brasil, 99,8% na Amazônia Legal. As principais estratégias de controle da doença são o combate ao vetor e o diagnóstico e tratamento oportunos (Oliveira-Ferreira et al, 2010). No entanto, com a possibilidade de crescente resistência aos fármacos antimaláricos derivados de artemisinina,

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Projeto: 1.420.846

última linha de tratamento, e inseticidas disponíveis atualmente

(Chrubasik et al, 2010; Dondorp et al, 2010; Kawada et al, 2011; Saralambaa et al, 2011; Pribluda et al., 2014, WHO, 2014), o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária tem sido uma das principais prioridades de pesquisa para o enfrentamento desse problema. Entretanto, embora mais de 30 antígenos tenham sido identificados como candidatos à vacina, muitos dos quais já testados em ensaios pré-clínicos e clínicos até de fase III, até o momento nenhum deles gerou uma perspectiva sólida de que uma vacina possa estar disponível nos próximos anos (Carvalho et al., 2002; Reed et al., 2006, Vaughan et al., 2012, Schwartz et al., 2012). Toma-se assim fundamental a pesquisa de novos candidatos vacinais, mais imunogênicos e mais eficazes.

Os antígenos GLURP (Proteína Rica em Glutamato), MSP3 (Proteína de Superfície de Merozoíto-3) e Pfs48/45 (Antígeno Pré-fertilização Pfs48/45) de *Plasmodium falciparum* são candidatos à vacina antimalárica, selecionados a partir de um racional comumente utilizado para candidatos vacinais, como a correlação dos títulos de anticorpos específicos com os diversos graus de proteção clínica de indivíduos vivendo em área endêmica. A candidata vacinal GMZ2 é uma proteína de recombinante que contém fragmentos conservados de GLURP e MSP3. Ensaios clínicos mostraram que a GMZ2 é bem tolerada, segura e imunogênica e que anticorpos induzidos após a imunização com GMZ2 foram específicos e funcionais, capazes de controlar o crescimento *in vitro* do *P. falciparum*. Além disso, foram demonstrados alta prevalência e títulos de anticorpos naturalmente adquiridos contra a GMZ2 em indivíduos residentes em área de alta endemicidade de malária na África. Importa, entretanto, verificar se o mesmo potencial é apresentado pelas populações-alvo no Brasil. Assim, pretendemos avaliar o perfil das respostas imune celular e humoral contra uma nova recombinante, GMZ2.6c, e seus componentes (MSP3, GLURP e Pfs48/45) e sua relação com o grau de imunidade antiparasitária em indivíduos

cronicamente expostos à malária residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira com alto e médio risco de transmissão. O estudo será concentrado nas cidades de Mâncio Lima (AC) e Guajará (AM). Também serão coletadas amostras de indivíduos que forem procurar assistência médica ou tratamento no Instituto Evandro Chagas (IEC) em Ananindeua (PA) e na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV) em Manaus (AM). Serão utilizadas proteínas recombinantes correspondentes à região C-terminal da MSP3 e às regiões N- e C-terminal da GLURP. Para mapeamento epitópico serão utilizados peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes regiões da MSP3 e da GLURP. A avaliação da resposta imune humoral será feita pela técnica de ELISA. A resposta imune celular será avaliada por citometria de fluxo e o

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cep@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

perfil de citocinas no plasma dos indivíduos e nas culturas celulares será avaliado utilizando-se kits comerciais e PCR em tempo real.

Critério de Inclusão:

O critério de inclusão compreenderá indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária já selecionadas que aceitem voluntariamente a participar do estudo e não façam parte do grupo de exclusão; pacientes com diagnóstico parasitológico de malária (grupo 1), indivíduos não infectados com história anterior de malária (grupo 2) e indivíduos sem malária clinicamente saudáveis, sem história anterior de malária (grupo 3).

Critério de Exclusão:

Grávidas, menores de 12 anos, indígenas, grupos especiais, pacientes com malária grave e complicada e indivíduos que por qualquer motivo se recusarem a fazer os testes.

Plano amostral:

Com malária (grupo 1) 100 Coleta de sangue e dados pessoais, clínicos e epidemiológicos

Controle (grupo 3) 120 Coleta de sangue e dados pessoais, clínicos e epidemiológicos

Sem malária (grupo 2) 100 Coleta de sangue e dados pessoais, clínicos e epidemiológicos

Centros Coparticipantes:

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS Ricardo Luiz Dantas Machado/Instituto Evandro Chagas/IEC/SVS/MS

Universidade de São Paulo Marcelo Urbano Ferreira/Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM/ Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado ((FMTHVD))

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45 em indivíduos cronicamente expostos à malária residentes em áreas

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 706 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-6011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: capfio cruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

endêmicas da Amazônia Brasileira com alto e médio risco de transmissão.

Objetivo Secundário:

-Avaliar o perfil das respostas imunes celular (populações linfocitárias, resposta proliferativa, perfil de produção de citocinas) e humoral (IgG e subclasses, IgM, IgE e IgA) contra a candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em indivíduos cronicamente expostos à malária residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira com alto e médio risco de transmissão;

-Avaliar a relevância das proteínas MSP-3, GLURP e Pfs48/45 no processo de aquisição de uma imunidade antiparasitária pela análise do perfil das respostas imunes humoral e celular e pelos dados clínicos e epidemiológicos;

-Estudar o efeito in vitro de anticorpos anti-GMZ2.6c sobre o crescimento de *P. falciparum* verificando uma possível participação no mecanismo de ADCC;

-Avaliar a extensão do polimorfismo genético dos antígenos MSP-3, GLURP e Pfs48/45 e seu papel no desenvolvimento de uma resposta imune específica;

-Estudar a relação entre os Antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II e a resposta imune contra a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma ("rouxidão") no local da punção, com duração de 3 a 4 dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para assepsia local, entre outros. Além disso, todos os cuidados para garantir que as informações contidas no questionário serão utilizadas única e exclusivamente para geração de dados para este projeto. As informações serão sigilosas e os indivíduos receberão um número de registro para impossibilitar a sua identificação. Esse questionário ficará sob a guarda do Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ. O acesso a qualquer informação do questionário estará restrita à coordenadora do projeto.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.420.848

Benefícios:

Benefícios diretos e indiretos: Nos casos de busca ativa, serão realizados exames para o diagnóstico da malária nos participantes da pesquisa. Com o diagnóstico da malária o paciente será orientado a procurar uma Unidade de Saúde responsável pelo atendimento na localidade, para avaliação médica e tratamento. Os resultados desse estudo não beneficiarão diretamente os pacientes, mas poderão, no futuro, beneficiar outras pessoas. O estudo da resposta imune em pacientes com malária tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores do organismo (imunológicos) na evolução das doenças. O conhecimento destas respostas poderá ser importante para se tentar prever a evolução da doença e com isto tentar evitar ou diminuir as formas graves e no futuro, ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos e devidamente fundamentado. Nessa terceira versão do projeto, a pesquisadora responsável incluiu os documentos solicitados no último parecer e respondeu à todas as pendências.

1) PROJETO:

a) Delineamento do estudo:

• "Delineamento reestruturado segundo documento carta-resposta, no entanto no projeto no formato Plataforma Brasil no delineamento a autora descreve o objetivo e a metodologia a ser desenvolvida. Ainda não foi escrito claramente o tipo de estudo, é estudo observacional, interventivo, ensaio clínico, estudo caso-control?"

Trata-se de um estudo primário, observacional prospectivo de corte transversal com amostra de conveniência, usual para estudos de busca ativa em áreas endêmicas de malária na Amazônia Brasileira.

Pendência atendida.

b) Metodologia:

• "Falta clareza em relação à quais etapas de laboratório serão realizadas em cada uma das instituições coparticipantes em Manaus, Pará e no Acre, e na instituição do proponente."

Na 2ª. versão já havíamos incluído as etapas em que serão realizadas em cada uma das

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: capfocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

instituições participantes. Incluímos na 3ª. versão as etapas que serão realizadas na instituição do proponente (Fiocruz/RJ).

Pendência atendida.

• "Não é critério de inclusão o fato de não fazer parte do critério de exclusão" – Essa frase foi retirada do projeto - critério de inclusão e exclusão (página 9).

Pendência atendida.

• "Não foi esclarecida a seleção do tamanho amostral de 80 participantes por centro, 50 casos e 30 controles nem o cálculo do número de domicílios necessário para atingir a amostras proposta. Necessário incluir a anuência das comunidades, por exemplo, das associações de vizinhos, que serão contatadas para as visitas domiciliares."

Pendência atendida.

Por se tratar de um estudo com amostras de conveniência, o número de amostras é estimado, considerando -se o tempo de permanência da equipe (20-30 dias) em área endêmica, ao limitado número de amostras processadas por dia de trabalho e ao número de casos registrados no período da coleta. É difícil também estimar o número de domicílios visitados pois, nas áreas rurais onde as amostras serão coletadas, as casas são distantes umas das outras. Além disso, a seleção das residências será feita de acordo com o usual para busca ativa de casos de malária em área endêmica, onde os moradores penduram um pano vermelho em local de fácil visualização (janela, porta, cerca, portão), indicando que há morador com sintomas de malária. Nas zonas rurais dos municípios onde serão coletadas as amostras não existe associação de moradores ou de vizinhos que possa dar qualquer tipo de carta de anuência.

Pendência atendida.

• "Existem inconsistências nos projetos e termos de consentimento em relação à quantidade de sangue que será coletada por participante, se será de 30 ou 20 ml. Considera-se que 30 ml seja uma quantidade elevada não justificável". Não localizamos na última versão do projeto anexado nem

Endereço: Av. Brasil 4038, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: capfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.430.846

nos termos de consentimento essa inconsistência. Mantivemos tanto no projeto quanto nos termos os mesmos 20 ml de sangue que serão coletados.

Pendência atendida.

• "Necessário incluir os termos de anuência e compromisso das secretarias municipais de saúde para garantir que os agentes possam colaborar no projeto.

Os pontos focais do Programa Nacional de Controle da Malária nos estados do Amazonas e do Acre designarão os agentes de saúde que acompanharão a equipe no período da coleta. Entretanto, é necessária a definição do período da coleta devido a flutuação de agentes de saúde nas localidades.

Pendência atendida.

c) Dos riscos e benefícios

• "O tratamento dos casos novos de malária diagnosticados não é benefício ao participante, mas é de responsabilidade dos pesquisadores que deverão velar para que o participante receba a terapia e atendimento necessário. Também deve ser corrigido no TALE e TCLE."

Consta nos termos e projeto que é considerado um benefício direto o fato de nos casos de busca ativa, serem realizados exames para o diagnóstico da malária nos participantes da pesquisa. Considerando que muitos dos participantes residem em localidades distantes e de difícil acesso aos centros de saúde, a realização do diagnóstico em sua residência pode ser considerada um benefício direto, apesar de já ser realizado rotineiramente pelos agentes de saúde nas localidades.

• "Inconsistência entre os orçamentos apresentados" (R\$207.000,00 e R\$ 207.200,00 – detalhando custeio com reagentes, passagens e diárias.). A diferença do valor foi corrigida.

Pendência atendida.

2 e 3) TCLE e TALE.

• "Incluir nos termos o endereço e telefones com membros das equipes locais, incluindo a possibilidade de ligar a cobrar".

Pendência atendida.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfio cruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.848

Na 2ª. versão havíamos incluído nos termos o endereço e os telefones com os membros da equipe. Na 3ª. versão foi incluída a frase que permite a possibilidade de ligar a cobrar, a versão, a data da revisão e o esclarecimento que o contato com o CEP IOC será apenas para retirar dúvidas relacionadas às questões éticas da pesquisa. Os termos também foram paginados e foi incluído o cabeçalho com o logotipo da instituição.

Pendência atendida.

• "Entende-se que visto que as crianças serão incluídas, o TALE será aplicado para adolescentes. Favor confirmar. No entanto, no TALE faz se referência à "criança" que deve ser suprimida."

Crianças (abaixo de 12 anos) serão excluídas do projeto, portanto, apenas adolescentes (acima de 12 anos) poderão participar. A palavra criança foi retirada dos termos.

Pendência atendida.

• "A linguagem tanto no TCLE quanto no TALE foi adaptada tomando-a mais acessível à compreensão dos participantes da pesquisa, entretanto, a linguagem não é inteiramente acessível, termos como "vacutainer" e "indenização", dentre outros podem não ser suficientemente claros para adolescentes dentre 12 e 17 anos." A palavra vacutainer foi substituída por "tubos de coleta de sangue" e a palavra indenização por "pagamento".

• "Não foi incluída a aplicação do TALE no projeto na íntegra."

Já estava incluída na 2ª. versão a aplicação do TALE no projeto - página 7.

Foi incluído local para rubrica do responsável do voluntário menor em cada página do TALE.

Pendência atendida.

5) DECLARAÇÃO DAS INSTITUIÇÕES

• "Foram adicionados os documentos das Instituições participantes declarando conhecer e cumprir as normas éticas vigentes no Brasil; garantindo a infraestrutura e assumindo a responsabilidade para a realização da pesquisa nas suas dependências; assumindo o compromisso de leitura e concordância com o parecer ético da instituição proponente e dando a autorização de realização

Endereço: Av. Brasil 4038, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

do estudo. Pendência parcialmente atendida, falta anuência das demais instituições coparticipantes onde serão contatados possíveis participantes voluntários."

As declarações foram incluídas.

Pendência atendida.

7) ACORDO ENTRE AS INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

"Foi incluído acordo entre as instituições participantes que contempla a operacionalização, compartilhamento, utilização do material biológico coletado e armazenado, a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e dos materiais. Entretanto, faltam demais participantes. Como se trata de documentos de caráter legal espera-se que sejam redigidos em papel timbrado e paginado. Os acordos apresentados parecem ser entre pesquisadores e não entre instituições."

Os acordos entre as instituições foram reescritos e anexados.

Pendência atendida.

8) DECLARAÇÃO

• "Foi incluída declaração da Coordenadora do projeto contendo a justificativa quanto à utilização futura das amostras biológicas humanas coletadas e armazenadas em papel não timbrado, sem carimbo, sem data e com assinatura inteligível".

Declaração foi refeita em papel timbrado, com carimbo e data.

Pendência atendida.

9) CRONOGRAMA

"O cronograma apresentado continua a indicar que a coleta de dados dos participantes terá início em outubro de 2015. A coleta de amostras deverá ter início após aprovação do protocolo pelos CEPs das Instituições proponente e coparticipantes."

O cronograma foi corrigido.

Pendência atendida.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.420.846

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto Folha de Rosto.pdf

TCLE / Termos de Assentimento / ANEXOIIIITALE.docx

TCLE / Termos de Assentimento / ANEXOIIITCLEcontroles.docx

TCLE / Termos de Assentimento/ ANEXOITCLEmalaria.docx

Carta resposta.docx

ANEXO V quest.docx

ANEXO IV decoord.docx

BIORREPOSITÓRIO.docx

Orçamento Orcamento.docx

Declaração de Instituição e Infraestrutura AnuenciaUSP.pdf

Declaração de Pesquisadores CartaMarcusLacerda_Lilian.pdf

Declaração de Pesquisadores AcordoMVGL.pdf

Declaração de Pesquisadores DeclaracaoMUF.pdf

Declaração de Pesquisadores ACORDOMUF.pdf

Declaração de Pesquisadores AcordoRLDM.pdf

Declaração de Pesquisadores AnuencialFMTAM.pdf

Declaração de Pesquisadores DeccompMVGL.pdf

Declaração de Pesquisadores DeccompRLDM.pdf

Projeto Detalhado /Brochura Investigador PROJETO.doc

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em Reunião Ordinária, realizada em 16.02.2015, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 468/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_515909.pdf	04/12/2015 20:41:47		Aceito
Outros	ANEXOvquest.docx	04/12/2015 20:40:16	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Outros	Cartaresposta.docx	04/12/2015 20:37:14	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.doc	04/12/2015 20:36:40	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Outros	ANEXOIVdeccoord.docx	04/12/2015 20:35:55	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOIIITALE.docx	04/12/2015 20:28:54	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOIIITCLEcontroles.docx	04/12/2015 20:28:28	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOITCLEmalaria.docx	04/12/2015 20:27:59	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AcordoMVGL.pdf	04/12/2015 20:26:42	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoMUF.pdf	04/12/2015 20:24:23	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ACORDOMUF.pdf	04/12/2015 20:20:05	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaUSP.pdf	04/12/2015 20:19:11	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaMarcusLacerda_Lilian.pdf	04/12/2015 16:39:22	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AcordoRLDM.pdf	26/08/2015 19:08:44	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuencialFMTAM.pdf	26/08/2015 19:07:50	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeccompMVGL.pdf	26/08/2015 19:07:07	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeccompRLDM.pdf	26/08/2015 19:06:51	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Orçamento	Orçamento.docx	26/08/2015 19:02:40	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 706 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: expfio cruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.420.846

Outros	BIORREPOSITORIO.docx	26/08/2015 19:00:20	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	11/08/2015 12:11:42		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

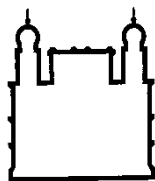
RIO DE JANEIRO, 23 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cspfiocruz@ioc.fiocruz.br

Página 12 de 12

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – MALÁRIA



Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária/CPD-Mal

Laboratório de Pesquisas em Malária - IOC/Fiocruz



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – MALÁRIA

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360 Tel.: (21) 3882-9011 e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Título do Projeto de Pesquisa para a População: Estudo da resposta imunológica contra proteínas que são candidatas a vacina contra a malária.

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em populações naturalmente imunizadas por exposição crônica residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária.

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

Colaboradores: Cesare Bianco Junior, Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, Evelyn Kety Pratt Riccio, Josué da Costa Lima Junior, Marcelo Urbano Ferreira, Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Paulo Renato Rivas Totino, Ricardo Luiz Dantas Machado

Endereço: Laboratório de Pesquisas em Malária, Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz. Avenida Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900.

Telefones: (21)- 38658135 **Fax:** (21) 38658145

Eu, Dra Lilian Rose Pratt Riccio e toda a equipe, responsáveis pelo projeto de pesquisa intitulado “Estudo da resposta imunológica contra proteínas que são candidatas à vacina contra a malária”, estamos fazendo um convite para você participar como voluntário deste nosso estudo. Esta pesquisa tem o objetivo de obter um melhor conhecimento da malária. A malária é uma doença transmitida por mosquito e que causa momentos de febre alta e calafrios após os quais a pessoa fica cansada e sem forças para trabalhar. Além de verificar se você tem esta doença, vai saber que parasitas causam esta doença e quais os tipos de respostas imunológica do organismo são benéficas. A sua participação como voluntário será apenas para doar sangue antes do tratamento.

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Para a realização do projeto serão feitos os seguintes exames, procedimentos e tratamentos com os seguintes objetivos:

Exame de sangue – Para diagnosticar malária, a retirada do seu sangue poderá ser feita na veia do antebraço ou no dedo, por um médico, farmacêutico ou biólogo membro da equipe da pesquisa. A coleta de sangue na veia do antebraço será feita com a agulha descartável e tubo de coleta de sangue e será tirada a quantidade de 20 ml de sangue, podendo em algum outro momento da pesquisa ser solicitado para outra nova coleta de sangue. O sangue coletado no dedo será feito fazendo um furinho no dedo médio com uma lanceta descartável na mão escolhida para o exame. As gotas de sangue serão colocadas em uma lâmina de vidro para ser examinada no microscópio.

Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (“rouxidão”) no local da punção, com duração de 3 a 4 dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para assepsia local, entre outros.

Benefícios diretos e indiretos: Em caso de busca ativa, serão realizados exames para diagnóstico da malária nos participantes da pesquisa. Com o diagnóstico da malária você será orientado a procurar a Unidade de Saúde responsável pelo atendimento na localidade para avaliação médica e tratamento. O tratamento será o normalmente usado para caso desse tipo. Todas as informações de tratamento serão dadas pelo profissional de saúde (médico e o enfermeiro responsável pela assistência) e qualquer alteração deverá ser comunicada ao pessoal responsável que verificará a necessidade de cuidados locais.

Os resultados desse estudo não o beneficiarão diretamente, mas poderão, no futuro beneficiar outras pessoas. O estudo da resposta imune em pacientes com malária tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores do organismo (imunológicos) na evolução das doenças. O conhecimento destas respostas poderá ser importante para se tentar prever a evolução da doença e com isto tentar evitar ou diminuir as formas graves e no futuro, ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina. No entanto, mais estudos são necessários para tentar esclarecer o seu papel na regulação da resposta imune levando à cura ou à proteção.

Após o consentimento e sua assinatura do TCLE da pesquisa, você responderá a um questionário, que será aplicado por um dos membros da equipe de investigadores, onde serão anotados seus dados pessoais, observações clínicas e dados epidemiológicos. Os dados tomados neste questionário serão utilizados única e exclusivamente para geração de dados para este projeto. Suas informações neste questionário serão sigilosas e você receberá um número de registro para impossibilitar a sua identificação. Esse questionário ficará sob a guarda do Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ. O acesso a qualquer informação do questionário estará restrita à coordenadora do projeto.

Os dados e todas as informações dadas por você estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/Fiocruz do Ministério da Saúde. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e o acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelos pesquisadores envolvidos no projeto. A sua participação é inteiramente voluntária e você é livre para recusar a participar, assim como para desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para seu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

A sua participação será sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer despesa e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Os gastos necessários para a participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também

do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

garantido um pagamento em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa. O material coletado para realização dos exames será devidamente acondicionado em nitrogênio líquido ou freezer -70°C e ficará sob a guarda da coordenadora do projeto, no Laboratório de Pesquisas em Malária – Fiocruz/RJ pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados.

Caso precise tirar maiores dúvidas sobre o projeto, você poderá ligar a qualquer momento que achar necessário, inclusive com a possibilidade de ligar a cobrar para: Dr. Marcelo Urbano (11) 30917746, em Cruzeiro do Sul (68) 99844921, Dr. Marcos Lacerda em Manaus (92) 21273443 ou 21273498, Dr. Ricardo Machado em Ananindeua (91) 32142382 ou 32142150, ou para a coordenadora do projeto Dra Lilian Rose Pratt Riccio através do telefone (21) 3865-8115. Você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz/RJ pelo telefone (21) 3882-9011, mas apenas tirar dúvidas sobre questões éticas relacionadas a essa pesquisa.

Eu, _____ aceito participar do estudo, consinto que os procedimentos de coleta acima descritos sejam realizados em minha pessoa e autorizo o depósito, armazenamento e utilização do material coletado para a realização deste estudo. Atesto que assinei duas vias do termo de consentimento de igual teor e fiquei com uma via.

_____ Data: _____
Assinatura do Pesquisador

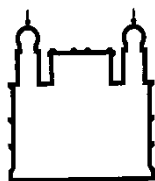
_____ Data: _____
Assinatura Testemunha

_____ Data: _____
Assinatura do voluntário



Em caso de analfabetismo ou impossibilidade de assinar, inserir impressão digital.

ANEXO III - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)



Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária/CPD-Mal

Laboratório de Pesquisas em Malária - IOC/Fiocruz



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360 Tel.: (21) 3882-9011 e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Título do Projeto de Pesquisa para a População: Estudo da resposta imunológica contra proteínas que são candidatas a vacina contra a malária.

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em populações naturalmente imunizadas por exposição crônica residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária.

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

Colaboradores: Cesare Bianco Junior, Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, Evelyn Kety Pratt Riccio, Josué da Costa Lima Junior, Marcelo Urbano Ferreira, Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Paulo Renato Rivas Totino, Ricardo Luiz Dantas Machado

Endereço: Laboratório de Pesquisas em Malária, Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz. Avenida Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900.

Telefone: (21) 3865-8135 **Fax:** (21) 3865-8145

Você está sendo convidado para participar como voluntário da pesquisa intitulada “Estudo da resposta imunológica contra proteínas que são candidatas a vacina contra a malária”. Seus pais ou responsável legal por você permitiu que você participasse. Entretanto, você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu não tendo nenhum problema se decidir desistir.

Esta pesquisa tem o objetivo de saber se você tem malária, doença que ocorre na região onde você mora. A malária é uma doença transmitida por mosquito e causa momentos de febre alta e calafrios após os quais a pessoa fica cansada e sem forças para trabalhar. Caso você seja portador desta doença você será orientado a procurar uma Unidade de Saúde responsável pelo atendimento na localidade, para avaliação médica e tratamento. O tratamento será o normalmente usado para casos desse tipo. Todas as informações de tratamento serão dadas pelo profissional de saúde (médico e o enfermeiro responsável pela

Rubrica do responsável do voluntário

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

assistência) e qualquer alteração deverá ser comunicada ao pessoal responsável que verificará a necessidade de cuidados locais.

Para diagnosticar malária, a retirada do seu sangue poderá ser feita na veia do antebraço ou no dedo, por um médico, farmacêutico ou biólogo membro da equipe da pesquisa. A coleta de sangue na veia do antebraço será feita com a agulha descartável e tubo de coleta de sangue e será tirada a quantidade de 20 ml de sangue, podendo em algum outro momento da pesquisa você ser solicitado para outra nova coleta de sangue. O sangue coletado no dedo será feito fazendo um furinho no dedo médio com uma lanceta descartável na mão escolhida para o exame. As gotas de sangue serão colocadas em uma lâmina de vidro para ser examinada no microscópio.

Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (“rouxidão”) no local da punção, com duração de 3 a 4 dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para assepsia local, entre outros.

Uma coisa boa de participar desse projeto de pesquisa é saber se você tem essa doença e receber o tratamento pela Unidade de Saúde responsável pelo atendimento na localidade.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados serão publicados, mas sem identificar os participantes da pesquisa.

A sua participação será sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer despesa e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Os gastos necessários para a participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantido um pagamento em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa. O material coletado para realização dos exames será devidamente acondicionado em nitrogênio líquido ou freezer -70°C e ficará sob a guarda da coordenadora do projeto, no Laboratório de Pesquisas em Malária – Fiocruz/RJ pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados.

Caso precise tirar maiores dúvidas sobre o projeto, você poderá ligar a qualquer momento que achar necessário, inclusive com a possibilidade de ligar a cobrar para: Dr. Marcelo Urbano (11) 30917746, em Cruzeiro do Sul (68) 99844921, Dr. Marcos Lacerda em Manaus (92) 21273443 ou 21273498, Dr. Ricardo Machado em Ananindeua (91) 32142382 ou 32142150, ou para a coordenadora do projeto Dra Lilian Rose Pratt Riccio através do telefone (21) 3865-8115. Você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz/RJ pelo telefone (21) 3882-9011, mas apenas tirar dúvidas sobre questões éticas relacionadas a essa pesquisa.

Rubrica do responsável do voluntário

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

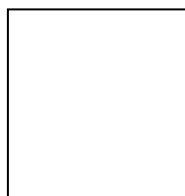
Eu, _____ fui informado sobre o projeto de maneira clara e tendo o consentimento já assinado pelo meu pai/responsável, declaro que concordo participar desta pesquisa. Consinto que os procedimentos de coleta acima descritos sejam realizados em minha pessoa e autorizo o depósito, armazenamento e utilização do material coletado para a realização deste estudo. Atesto que assinei duas vias do termo de consentimento de igual teor e fiquei com uma via.

_____ Data: _____
Assinatura do Pesquisador

_____ Data: _____
Assinatura Testemunha

_____ Data: _____
Assinatura Responsável

_____ Data: _____
Assinatura do menor voluntário

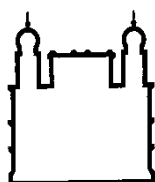


Em caso de impossibilidade de o responsável assinar inserir impressão digital



Em caso de impossibilidade de o menor assinar inserir impressão digital

ANEXO IV - QUESTIONÁRIO



Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária/CPD-Mal

Laboratório de Pesquisas em Malária - IOC/Fiocruz



REGISTRO Nº

Data:

PROJETO: Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em populações naturalmente imunizadas por exposição crônica residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária.

SEXO: <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M		
IDADE:	NATURALIDADE:	PROCEDÊNCIA:
ENDEREÇO ATUAL:		
NÚMERO DE RESIDENTES NO ENDEREÇO ATUAL:		
PROFISSÃO:		
TEMPO DE RESIDÊNCIA (ANOS):		
Área endêmica (anos) :		(anos):
HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA		
NÚMERO DE INFECÇÕES ANTERIORES DE MALÁRIA:		
Espécies: <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Não lembra		
NÚMERO DE INFECÇÕES NO ÚLTIMO ANO:		
Espécies: <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Não lembra		
DATA DA ÚLTIMA INFECÇÃO:		
Espécies: <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Não lembra		
LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO:		
FEZ O TRATAMENTO COMPLETO?: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
JA FOI HOSPITALIZADO COM MALÁRIA: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		Data:
MALÁRIA GRAVE NA FAMÍLIA: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		Data:
OBS:		
TEM ALGUÉM NA FAMÍLIA COM MALÁRIA OU QUE TEVE MALÁRIA RECENTEMENTE? <input type="checkbox"/> Sim		
<input type="checkbox"/> Não Data:		

EXPOSIÇÃO A INFECÇÃO MALÁRICA

LOCALIZAÇÃO DA CASA <input type="checkbox"/> Floresta <input type="checkbox"/> Coleção d'água <input type="checkbox"/> Cidade <input type="checkbox"/> Nenhuma
TIPO DE CASA (proteção em relação ao contato com mosquito) <input type="checkbox"/> Boa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma
ATIVIDADES AO AMANHECER: ATIVIDADES AO ANOITECER:
SABE COMO A MALÁRIA É TRANSMITIDA? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Foi informado <input type="checkbox"/> Foi informado, mas não acredita COMO?:
USO DE MEDIDAS PROFILÁTICAS <input type="checkbox"/> Mosquiteiro <input type="checkbox"/> Inseticida <input type="checkbox"/> antimaláricos <input type="checkbox"/> Outras <input type="checkbox"/> Nenhuma Data da última borrifação de inseticida (FNS):

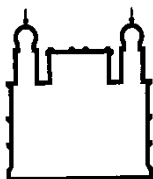
INFECÇÃO ATUAL

SINTOMAS <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Calafrios <input type="checkbox"/> Náusea/Vômito <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Sudorese <input type="checkbox"/> Nenhum
DATA DO INICIO DOS SINTOMAS:
DIAGNÓSTICO: <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> <i>P. malariae</i> <input type="checkbox"/> Nenhuma
PARASITEMIA:
LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO: RECEBEU TRANSFUÇÃO DE SANGUE?: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Data: É DOADOR DE SANGUE?: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Data da última doação:

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

<input type="checkbox"/> GOTA ESPESSA <input type="checkbox"/> DISTENSÃO SANGUÍNEA <input type="checkbox"/> SANGUE
--

ANEXO V - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE



Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária/CPD-Mal

Laboratório de Pesquisas em Malária - IOC/Fiocruz



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – CLINICAMENTE SADIOS (CONTROLES)

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360 Tel.: (21) 3882-9011 e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Título do Projeto de Pesquisa para a População: Estudo da resposta imunológica contra proteínas que são candidatas a vacina contra a malária.

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em populações naturalmente imunizadas por exposição crônica residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária.

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

Colaboradores: Cesare Bianco Junior, Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, Evelyn Kety Pratt Riccio, Josué da Costa Lima Junior, Marcelo Urbano Ferreira, Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Paulo Renato Rivas Totino, Ricardo Luiz Dantas Machado

Endereço: Laboratório de Pesquisas em Malária, Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz. Avenida Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900.

Telefones: (21)- 38658135 **Fax:** (21) 38658145

Eu, Dra Lilian Rose Pratt Riccio e toda a equipe, responsáveis pelo projeto de pesquisa intitulado “Estudo da resposta imunológica contra proteínas que são

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

candidatas à vacina contra a malária”, estamos fazendo um convite para você participar como voluntário deste nosso estudo. Esta pesquisa tem o objetivo de obter um melhor conhecimento da malária. A malária é uma doença transmitida por mosquito e que causa momentos de febre alta e calafrios após os quais a pessoa fica cansada e sem forças para trabalhar. Além de verificar se você tem esta doença, vai saber que parasitas causam esta doença e quais os tipos de respostas imunológica do organismo são benéficas. A sua participação como voluntário será apenas para doar sangue.

Para a realização do projeto serão feito os seguintes exames, procedimentos com os seguintes objetivos:

Exame de sangue – O exame de sangue para exclusão da infecção malárica será realizado após a retirada do seu sangue que poderá ser feita na veia do antebraço ou no dedo, por um médico, farmacêutico ou biólogo membro da equipe da pesquisa. A coleta de sangue na veia do antebraço será feita com a agulha descartável e tubo de coleta de sangue e será tirada a quantidade de 20 ml de sangue, podendo em algum outro momento da pesquisa ser solicitado para outra nova coleta de sangue. O sangue coletado no dedo será feito fazendo um furinho no dedo médio com uma lanceta descartável na mão escolhida para o exame. As gotas de sangue serão colocadas em uma lâmina de vidro para ser examinada no microscópio.

Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (“rouidão”) no local da punção, com duração de 3 a 4 dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados, como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para assepsia local, entre outros.

Benefícios esperados: Os resultados desse estudo não o beneficiarão diretamente, mas poderão, no futuro, beneficiar outras pessoas. O estudo da resposta imune em pacientes com malária tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores do organismo (imunológicos) na evolução das doenças. O conhecimento destas respostas poderá ser importante para se tentar prever a evolução da doença e com isto tentar evitar ou diminuir as formas graves e no futuro, ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina. No entanto, mais estudos são necessários para tentar esclarecer o seu papel na regulação da resposta imune levando à cura ou à proteção.

Após o consentimento e sua assinatura do TCLE da pesquisa, você responderá a um questionário, que será aplicado por um dos membros da equipe de investigadores, onde serão anotados seus dados pessoais, observações clínicas e dados epidemiológicos. Os dados tomados neste questionário serão utilizados única e exclusivamente no projeto em questão. Suas informações neste questionário serão

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

sigilosas e você receberá um número de registro para impossibilitar a sua identificação. Esse questionário ficará sob a guarda do Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ. O acesso a qualquer informação do questionário estará restrita à coordenadora do projeto.

Os dados e todas as informações dadas por você estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/Fiocruz do Ministério da Saúde. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e o acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelos pesquisadores envolvidos no projeto. A sua participação é inteiramente voluntária e você é livre para recusar a participar, assim como para desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para seu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

A sua participação será sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer despesa e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Os gastos necessários para a participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantido um pagamento em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa. O material coletado para realização dos exames será devidamente acondicionado em nitrogênio líquido ou freezer -70°C e ficará sob a guarda da coordenadora do projeto, no Laboratório de Pesquisas em Malária – Fiocruz/RJ pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados.

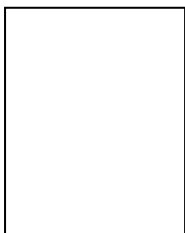
Caso precise tirar maiores dúvidas sobre o projeto, você poderá ligar a qualquer momento que achar necessário, inclusive com a possibilidade de ligar a cobrar para: Dr. Marcelo Urbano (11) 30917746, em Cruzeiro do Sul (68) 99844921, Dr. Marcos Lacerda em Manaus (92) 21273443 ou 21273498, Dr. Ricardo Machado em Ananindeua (91) 32142382 ou 32142150, ou para a coordenadora do projeto Dra Lilian Rose Pratt Riccio através do telefone (21) 3865-8115. Você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz/RJ pelo telefone (21) 3882-9011, mas apenas tirar dúvidas sobre questões éticas relacionadas a essa pesquisa.

Eu, _____
aceito participar do estudo, consinto que os procedimentos de coleta acima descritos sejam realizados em minha pessoa e autorizo o depósito, armazenamento e utilização do material coletado para a realização deste estudo. Atesto que assinei duas vias do termo de consentimento de igual teor e fiquei com uma via.

_____ Data: _____
Assinatura do Pesquisador

_____ Data: _____
Assinatura Testemunha

_____ Data: _____
Assinatura do Voluntário



Em caso de analfabetismo ou
impossibilidade de assinar
inserir impressão digital