

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

Resposta imune humoral de longa duração na malária por *Plasmodium vivax*:
células B de memória contra protótipos vacinais baseados na DBP II (Duffy
Binding Protein)

por

Raianna Farhat Fantin

Belo Horizonte
2018

DISSERTAÇÃO

MCS–IRR R. F. FANTIN

2018

RAIANNA FARHAT FANTIN

Resposta imune humoral de longa duração na malária por *Plasmodium vivax*:
células B de memória contra protótipos vacinais baseados na DBP II (Duffy
Binding Protein)

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde do
Instituto René Rachou, como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Ciências – área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Coorientação: Dra. Flora Satiko Kano

Dra. Camilla Valente Pires

Belo Horizonte

2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

F216r
2018

Fantin, Raianna Farhat.

Resposta imune humoral de longa duração na malária por *Plasmodium vivax*: células B de memória contra protótipos vacinais baseados na DBP II (Duffy Binding Protein)/ Raianna Farhat Fantin – Belo Horizonte, 2018

XIV, 68 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 69-81

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

1. *Plasmodium vivax* 2. Formação de Anticorpos 3. DBPII 4. Vacina. I. Título II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III. Kano, Flora Satiko IV. Pires, Camilla Valente (Coorientação)

CDD – 22. ed. –616.936

RAIANNA FARHAT FANTIN

Resposta imune humoral de longa duração na malária por *Plasmodium vivax*:
células B de memória contra protótipos vacinais baseados na DBP II (Duffy
Binding Protein)

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde do
Instituto René Rachou, como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Ciências – área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.

Banca examinadora:

Prof. Dr^a Luzia Helena Carvalho (IRR/Fiocruz) – Presidente

Prof. Dr^a Maria Marta Figueiredo (Detechta Biotecnologia S.A) – Titular

Prof. Dr Pedro Augusto Carvalho Costa (Detechta Biotecnologia S.A) – Titular

Prof. Dr^a Isabela Penna Cerávolo (IRR/Fiocruz) – Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 26/02/2018

“E pela minha lei, a gente era obrigado a ser feliz”

(Chico Buarque)

Dedico este trabalho ao meu pai, Persio, principal incentivador da minha carreira acadêmica e minha maior referência de ser humano.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Luzia, pela oportunidade e confiança. Obrigada por me auxiliar nesse meu início de caminhada, pelos puxões de orelha, pela paciência, persistência e por acreditar na minha capacidade de evoluir;

À Dra. Flora, por toda gentileza e disposição em auxiliar no que fosse preciso, especialmente nessa fase final. Muito obrigada pela paciência e delicadeza;

À Dra. Camilla, por me ajudar em cada degrau dessa subida, por ter estado sempre disposta a ouvir meus questionamentos, por ter se mostrado tão aberta a todo e qualquer tipo de dúvida e angústia surgida nas mais diversas fases desse mestrado. Você foi essencial nessa caminhada;

Aos inúmeros professores, internos e externos ao IRR, que também fizeram parte da minha formação durante as mais diversas disciplinas;

À Ruth, por ser a mais disposta, competente e agradável aluna de Iniciação Científica com quem eu já tive a oportunidade de trabalhar;

À Plataforma de Anticorpos Monoclonais, em especial a Lucélia, por oferecer infraestrutura e equipamentos sempre que necessário;

Ao Instituto René Rachou, por me abrigar desde o início da graduação, primeiro como aluna de Iniciação Científica e agora como mestranda. É uma honra ter podido ser formada dentro de um instituto de tanta competência e reconhecimento;

À biblioteca do IRR, pelo acesso gratuito à informação técnico-científica;

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Às demais agências CNPq, FAPEMIG e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do IRR/FIOCRUZ, pela infraestrutura e recursos;

À comunidade de Rio Pardo, pela disposição, por acreditar e confiar no nosso trabalho;

Aos amigos e companheiros de jornada que fiz nessa caminhada. Em especial ao clã composto por Michelle, Daniela, Daniel, Barbara, Jessica e Leticia. Obrigada por todos os momentos de diversão (dentro e fora da instituição), pelo aprendizado cotidiano e por me fazerem evoluir como ser humano através da convivência diária. Sem vocês não teria sido metade do que foi;

À Marina, Denise e Ana Carolina por toda doçura e generosidade que sempre tiveram comigo;

Aos demais integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária, em especial à Mika, por se mostrar sempre disposta a ajudar e resolver quaisquer problemas que surgissem;

Aos professores da PUC, em especial Alzira, Raul, Cristiane e Marcelo, pelo incentivo e pelas oportunidades que me foram dadas ao longo e depois do curso;

Aos meus colegas de graduação que se tornaram verdadeiramente indispensáveis na minha vida: Marco Aurélio, Jessica, Gabriela, Marcella e Ana Luiza. Vocês fizeram parte dessa caminhada desde o início! Obrigada por me incentivarem e torcerem pelo meu sucesso;

Aos amigos que não fazem parte do círculo profissional, mas que se fazem sempre presentes em minha vida: Rafaela, Marcela, Letícia, Carol e Stefany. Obrigada pelos momentos de cumplicidade, apoio e diversão;

Ao meu pai, meu exemplo de caráter, persistência e competência. Por me apoiar em quaisquer que fossem os meus sonhos, pelo suporte emocional e financeiro e por acreditar em mim mais do que qualquer outra pessoa nesse mundo. A você, meu pai, meu mais sincero agradecimento! Espero poder fazer um dia pelos meus filhos tudo o que você fez e faz por mim;

À minha mãe por me ensinar a usar uma das mais valiosas ferramentas que um ser humano pode ter: a força do pensamento! Obrigada pelo incentivo e por me fazer acreditar em mim;

Às minhas irmãs, Marcella e Liz, por serem a luz da minha vida. Por trazerem de volta para perto de mim a maravilhosa puerilidade da infância. Por fazerem de mim um ser humano melhor, mais empático e amoroso;

À família Fantin, em especial minha avó Muna, por ser tão agregadora e presente. Os momentos partilhados com vocês são muito especiais e dão um suporte inimaginável;

À Deus, amado pai, ao mestre Jesus e a espiritualidade amiga, que estão sempre presentes em minha vida e nunca falharam em me auxiliar quando precisei.

RESUMO

O *Plasmodium vivax* constitui um grande desafio para os programas de controle de malária devido à sua ampla distribuição geográfica, alta frequência de infecções submicroscópicas, e capacidade de induzir recaídas devido as formas latentes presentes no fígado (hipnozoítos). Nesse contexto, o desenvolvimento de vacinas contra *P. vivax* tem sido considerado prioritário pelos programas que visam controlar e/ou eliminar a transmissão de malária. A grande dependência do *P. vivax* de uma proteína apical – Duffy Binding Protein (DBPII) – para a invasão de reticulócitos humanos DARC positivos faz com esta proteína seja considerada o principal alvo para vacinas contra as fase sanguíneas do parasito. No entanto, a existência de polimorfismos na DBPII induz frequentemente imunidade do tipo cepa-específica. No intuito de se obter uma resposta de anticorpos anti-DBPII de ampla reatividade, sem a interferência de polimorfismos, diferentes construções vacinais têm sido obtidas, incluindo a chamada DEKnull-2, cujos epítomos polimórficos foram removidos (JH Adams, USF, Tampa, FL, USA). No presente estudo, avaliou-se o potencial da DEKnull-2 para induzir resposta imune humoral de longo prazo (anticorpos e células B de memória, MBCs). Para tal, a população de estudo foi constituída de 42 indivíduos bem caracterizados, com histórico de longa exposição à malária na região da Amazônia brasileira (comunidade de Rio Pardo, Presidente Figueiredo, AM). O delineamento experimental incluiu uma abordagem retrospectiva, com quatro cortes transversais, sendo três realizados durante o primeiro ano de acompanhamento (linha de base, 6 e 12 meses) e o quarto, conduzido 6 anos após o início do estudo. A resposta imune humoral foi avaliada pela sorologia convencional (ELISA), utilizando-se proteínas recombinantes baseadas na DBPII (cepa referência DBPII Sal-1 e DEKnull-2), e por um ensaio funcional que avalia anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor (BIABs). De acordo com a resposta de anticorpos inibitórios, os indivíduos foram classificados como: (a) Respondedor de Elite, ER (n=11), indivíduos cuja resposta de BIABs permaneceu estável ao longo do estudo; (b) Respondedor Transiente, TR (n=15), cujos BIABs flutuaram ao longo do tempo; (c) Persistente Não-Respondedor, PNR (n=16), cuja resposta BIABs não pôde ser detectada em nenhum momento do estudo. De interesse, o perfil dos ER foi associado a uma maior exposição aos mosquitos vetores, já que a maioria neste grupo vivia próximo aos pequenos cursos d'água (Igarapé) onde a incidência de

malária foi maior. Em seguida, buscou-se investigar se o perfil de células B de memória (MBCs) antígeno-específicas poderia diferenciar os grupos ER, RT e PNR. Para isso, MBCs específicas para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 foram avaliadas através de um ensaio imunoenzimático de ELISpot otimizado, capaz de detectar células secretoras de anticorpos IgG (ASCs). Em conjunto, os resultados permitiram validar a DEKnull-2 como um promissor antígeno candidato a vacina, e demonstrar ainda que: (i) em comparação com DBPIISal-1 (cepa de referência), DEKnull-2 parece induzir maiores níveis de anticorpos, que permaneceram estáveis durante o período de baixa transmissão da malária (6 anos de acompanhamento); (ii) independentemente do antígeno avaliado (DEKnull-2 ou DBPII Sal-1), o perfil das células B de memória (IgG+ MBCs) não permitiu diferenciar os indivíduos cujas BIAbs eram estáveis (ER) daqueles com resposta instável (TR). Visando estudos futuros para caracterizar mecanismos envolvidos no desenvolvimento de uma resposta de anticorpos inibitórios estável e de longa-duração, faz-se necessário avaliar diferentes subpopulações de MBCs que possam estar envolvidas na resposta imune protetora.

Palavras-chave: Plasmodium vivax; células B de memória; DBPII; vacina.

ABSTRACT

Plasmodium vivax is particularly challenging for malaria control because of its wider global distribution, high frequency of sub-microscopic infections, and ability to produce relapses from long-lasting liver-stages infections. In this context, the development of vaccines against *P. vivax* may be critical in the success of a research agenda to underpin malaria control and elimination. The large dependence on the Duffy binding protein II (DBP_{II}) for *P. vivax* invasion of human DARC positive reticulocytes makes it a prime target for *P. vivax* blood-stage vaccines. However, the existence of DBP_{II} polymorphisms often leads to induction of strain-specific immunity. In order to obtain a broad anti-DBP_{II} antibody response, without the interference of the polymorphisms, numerous vaccine constructs have been developed, among them a synthetic DBP_{II} named DEKnull-2, whose major polymorphic epitopes were removed (JH Adams, USF, Tampa, FL, USA). In the present study, we investigated whether the DEKnull-2 induces a long-term humoral immune response (antibodies and memory B cells, MBCs). The study population included 42 well-characterized individuals with history of long-term exposure to malaria in the Amazonian area (Rio Pardo community, Presidente Figueiredo AM). The study design included a retrospective approach with four cross-sectional surveys, three carried-out during the first follow-up year (baseline, 6 and 12 months), and one carried-out 6 years later. Antigen-specific antibodies were evaluated by conventional serology (ELISA) using recombinant DBP_{II} antigens (the reference strain DBP_{II} Sal-1 and the DEKnull-2), and by a functional assay, in which antibodies able to inhibit the interaction ligand-receptor can be detected (inhibitory antibodies, BIABbs). According to inhibitory antibody response exposed-individuals were classified as: (a) Elite Responder, ER (n=11), consisting of individuals whose BIABbs response remained stable throughout the follow-up study; (b) Transient Responder, TR (n=15), whose BIABbs fluctuated over time; (c) Persistent Non-responder, PNR (n=16), whose BIABbs response could not be detected at any time-point of the follow-up study. Of interest, the profile of ER was associated with higher exposure to mosquito vector, since most of them were living near small streams (named Igarapé) with much higher incidence of malaria. Next, we evaluated whether the profile of specific memory B cells could differentiate between ER, TR and PNR groups. For that, Sal-1 and DEKnull-2 specific-MBCs were evaluated by an optimized ELISpot

immunoenzymatic assay that detects IgG antibody secreting cells (ASCs). Taken together, the results validated DEKnull-2 as a potential vaccine candidate, and demonstrated that: (i) as compared with DBPIISal-1 (reference strain), DEKnull-2 seems to induces higher levels of antibody responses that is stable during the low malaria transmission period (6-years of follow-up); (ii) regardless the antigen assayed (DEKnull-2 or DBPII Sal-1), the profile of memory B cells (IgG+MBCs) did not allow differentiate individuals whose BIABs were stable (ER) from those with instable BIABs response (TR). Aiming to characterize mechanisms involved in the development of a long-term stable inhibitory antibody response, future studies should evaluate different subpopulation of MBCs.

Key words: Plasmodium vivax; Memory B cells; DBPII; vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do ciclo do Plasmodium spp. no hospedeiro vertebrado.....	23
Figura 2: Representação esquemática dos domínios estruturais da Duffy Binding Protein de Plasmodium vivax (PvDBP)	32
Figura 3: Representação esquemática do protótipo vacinal DEKnull-2.....	34
Figura 4: Mapa do estado do Amazonas, noroeste do Brasil, indicando o assentamento agrícola de Rio Pardo.....	38
Figura 5: Casos de malária no assentamento agrícola de Rio Pardo/AM registrados pelo SIVEP entre os anos de 2008 e 2017.....	39
Figura 6: Ilustração esquemática do princípio do ensaio de ELISpot.....	45
Figura 7: Resposta de anticorpos aos antígenos de fase sanguínea de P. vivax em residentes de área endêmica para malária (Rio Pardo – AM).....	47
Figura 8: Perfil da resposta de anticorpos inibitórios da interação DBPII-DARC em seis anos de acompanhamento.....	49
Figura 9: Influência do local de moradia dos indivíduos no perfil da resposta de BIABs contra a DBPII.....	50
Figura 10: Resposta de células B de memória do tipo IgG total em indivíduos expostos à malária (Rio Pardo) versus indivíduos nunca expostos (Belo Horizonte).....	52
Figura 11: Frequência (%) de células secretoras de anticorpos (ASCs) antígeno-específicas para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 em relação ao número total de células secretoras de anticorpos.....	53
Figura 12: Resposta de células B de memória (MBCs) antígeno-específicas de nos indivíduos com distintos perfis da resposta de BIABs.....	55
Figura 13: Número de células secretoras de anticorpos por indivíduo entre os grupos.....	57
Figura 14: Frequência de resposta de células B de memória antígeno-específica para DBPII-Sal1 e DEKnull-2.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características epidemiológicas e demográficas dos indivíduos selecionados para o estudo.....	40
Tabela 2: Incidência de malária entre os grupos Respondedor de Elite, Respondedor Transiente e Persistente Não Respondedor.....	51

Lista de abreviaturas e siglas

- ALP – Enzima fosfatase alcalina (alkaline phosphatase)
- AMA1 - Antígeno 1 de membrana apical (Apical membrane antigen 1)
- ASCs – Células secretoras de anticorpos (antibody secreting cells)
- BCIP/NBT - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato com nitroazul de tetrazólio (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium)
- BIAbs – Anticorpos inibidores de ligação (binding-inhibitory antibodies)
- BMIM – Biologia Molecular e Imunologia da Malária
- DARC - Antígeno do grupo sanguíneo Duffy/DARC; receptor para quimiocinas (Duffy Antigen Receptor for chemokines)
- Brz-1 – Variante de DBPII isolada de cepa proveniente da Amazônia brasileira
- DBL - Domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (Duffy binding like domain)
- DBP - Proteína de ligação ao eritrócito (Duffy binding protein)
- DBPII - Região II da Duffy binding protein de *P. vivax*
- DEKnull-2– Proteína DBPII mutada com domínio variável (DEK) ausente, segunda geração
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DO – Densidade ótica
- EBP – Família de proteínas ligantes aos eritrócitos
- ELISA - Ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- ELISpot – Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked ImmunoSpot)
- Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
- HEPES - 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
- IgG – Imunoglobulina da classe G
- IL-2 – Interleucina 2
- IR – Índice de reatividade
- IRR – Instituto René Rachou
- MBCs – Células B de memória (memory B cells)
- MSP1₁₉ – Porção de 19 kDa da proteína 1 de superfície do merozoíto
- OPD - dicloridrato de o-fenilenodiamina (o-Phenylenediamine dihydrochloride)

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

PBS – Tampão fosfato salino (phosphate saline buffer)

PfCS – Proteína circunsporozoíta de *Plasmodium falciparum*

PvCS – Proteína circunsporozoíta de *Plasmodium vivax*

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

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

RE: Respondedor de Elite

PRN: Persistente Não Respondedor

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

RT: Respondedor Transiente

SBF – Soro bovino fetal

TCD4⁺ - Linfócitos T auxiliares (T helper lymphocyte)

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

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

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

VBT – Vacina Bloqueadora de Transmissão

WHO – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 A malária no Brasil e no mundo.....	20
1.2 Ciclo biológico do parasito.....	21
1.3 Imunidade naturalmente adquirida contra a malária.....	23
1.3.1 Imunidade humoral naturalmente adquirida contra <i>P. vivax</i>	24
1.4 Longevidade da resposta imune humoral na malária.....	26
1.5 Principais antígenos candidatos à vacina de <i>P. vivax</i>	27
1.5.1 Antígenos envolvidos no bloqueio da transmissão do parasito pelo mosquito vetor.....	27
1.5.2 Antígenos envolvidos nos estágios pré-eritrocíticos.....	28
1.5.3 Antígenos envolvidos no estágio eritrocítico.....	29
1.5.3.1 Duffy Binding Protein (DBP).....	30
1.5.3.2 Antígenos vacinais baseados em epítomos conservados da DBPII	33
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 METODOLOGIA.....	38
4.1 Área de estudo.....	38
4.2 Proteínas recombinantes.....	40
4.2.1 Proteína de ligação ao antígeno Duffy, região II (Duffy Binding Protein II)	40
4.2.2 Construção de DEKnull-2.....	40
4.3 Obtenção de plasma e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	41
4.4 Ensaio Sorológicos.....	42
4.4.1 Ensaio sorológico convencional de ELISA para detecção de anticorpos IgG.....	42
4.4.2 Transfecção de células COS-7 e Ensaio Funcional de Ligação.....	42
4.5 Ensaio imunoenzimático de ELISpot para detecção de células secretoras de anticorpo contra DBPII Sal-1 e o protótipo vacinal DEKnull-2.....	43
4.6 Análises Estatísticas.....	45

5 RESULTADOS.....	46
5.1 Perfil sorológico para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 durante o estudo longitudinal (2008 – 2014)	46
5.2 Categorização dos indivíduos do estudo de acordo com o perfil da resposta de anticorpos inibidores de ligação DARC – DBPII (BIAbs).....	48
5.3 Local de residência como variável associada ao perfil de anticorpos inibitórios dos grupos RE, RT e PNR.....	50
5.4 Incidência da infecção por P. vivax entre os grupos RE, RT e PNR.....	51
5.5 Células B de memória antígeno-específicas em indivíduos com histórico de longa exposição à malária por P. vivax.....	52
5.5.1 Frequência de resposta de células B de memória antígeno-específicas	56
6 DISCUSSÃO.....	59
6.1 Longevidade de resposta imune humoral em indivíduos com histórico de exposição contínua à malária.....	60
6.1.1 Relação entre a estabilidade da resposta de anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor e a maior exposição aos mosquitos vetores.....	60
6.2 Resposta de células B antígeno-específicas para a DBPII Sal-1 e DEKnull2.....	64
6.2.1. Avaliação de MBCs específicas para DBPII- Sal1 e DEKnull-2 em indivíduos categorizados de acordo com o perfil da resposta de anticorpos inibitórios.....	65
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
Referências.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1A Malária no Brasil e no mundo

A malária, doença parasitária de grande importância, representa um grande desafio para as autoridades em saúde pública do mundo. Causada por protozoários do filo Apicomplexa, atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies de plasmódios capazes de infectar distintos hospedeiros vertebrados, incluindo primatas, aves e répteis. Se tratando da doença humana, cinco espécies infectam mais frequentemente o homem: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*; enquanto as duas primeiras são consideradas as mais importantes do ponto de vista de saúde pública, a última, conhecida por infectar primatas do velho mundo, tem crescido em importância no sudeste asiático (Barber et al., 2017; Revisto por Phillips et al., 2017). No Brasil, recentemente, uma sexta espécie, *Plasmodium simium*, conhecida por infectar primatas não humanos, tem sido frequentemente associada a surtos de malária humana nas regiões de mata atlântica, particularmente na região serrana do Estado do Rio de Janeiro (Brasil et al., 2017).

A malária humana ainda é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, sendo endêmica na África subsaariana, sudeste asiático, oriente médio, Oceania e América Latina. No ano de 2016 foram registrados aproximadamente 216 milhões de casos no mundo com cerca de 455 mil mortes, sobretudo no continente africano (WHO, 2017). Especificamente no Brasil, neste mesmo ano, foram registrados cerca de 128 mil casos da doença (SVS, 2016), sendo a grande maioria proveniente da região chamada Amazônia Legal, que contempla os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Ainda que expressivo, esse número representa uma queda de cerca de 75% em relação aos números registrados no país desde o início dos anos 2000 (WHO, 2017). Esse resultado muito se deve, em grande parte, ao Programa Nacional de Controle da Malária na Região Amazônica, que preconiza ações integradas de controle vetorial, diagnóstico oportuno e tratamento adequado (PAHO, 2016). Das espécies circulantes no país, destaca-se *P. vivax*, que é responsável por cerca de 80% dos casos registrados da doença. Via de regra, a malária por *P. vivax* é considerada benigna e muitas vezes assintomática; no entanto, nos últimos anos, casos graves por esta espécie têm sido registrados cada

vez mais frequentemente em diversas regiões endêmicas, inclusive no Brasil (Andrade et al., 2010; Howes et al., 2016; Recht et al., 2017). Por esse motivo, esforços para o desenvolvimento de vacinas, ferramentas diagnósticas e vigilância epidemiológica têm se acentuado no intuito de alcançar a meta de eliminação da doença em algumas regiões do globo.

1.2 Ciclo biológico do parasito

O ciclo biológico dos plasmódios inclui duas fases distintas de reprodução: uma sexuada que acontece dentro do hospedeiro invertebrado, fêmeas do gênero *Anopheles*, e outra assexuada, que se desenvolve no hospedeiro vertebrado (Figura 1). Durante o repasto sanguíneo do hospedeiro invertebrado, esporozoítos (forma infectante do parasito para o hospedeiro vertebrado) são inoculados na pele juntamente com vasodilatadores e anticoagulantes. Uma vez na pele do hospedeiro, os esporozoítos podem ficar ali durante dias até que atinjam o sistema circulatório e então migrem para o fígado para infectar hepatócitos. Alguns autores descreveram uma rota diferente de migração dos esporozoítos onde eles, após atravessarem o epitélio do hospedeiro, podem vir a atingir o sistema linfático. Todavia, os parasitos não parecem chegar ao fígado através desta via (Amino et al., 2006). O processo de invasão dos hepatócitos é complexo e envolve inúmeras interações específicas. Sabe-se que os esporozoítos migram por vários hepatócitos antes de se estabelecerem, no entanto, tal comportamento ainda tem função desconhecida (Revisto por Mota & Rodriguez, 2004). Para as espécies *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos podem permanecer em estado de latência no fígado e, eventualmente, levarem a episódios de recaída da doença. A essas formas especiais dá-se o nome de hipnozoítos (Krotoski et al., 1985). Já dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, por meio de sucessivas divisões por esquizogonia, dão origem aos esquizontes. Através do processo de brotamento de vesículas, os esquizontes maduros liberam merossomas, que ao atingirem a corrente sanguínea, liberam merozoítos (Sturm, 2006). Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos passam a invadir hemácias, dando início ao ciclo eritrocítico.

A invasão das hemácias é um processo complexo, específico e altamente dependente de interações ligante-receptor. Se tratando de *P. falciparum*, inúmeras

vias de invasão já foram descritas (Petter & Duffy, 2015), no entanto para *P. vivax*, atualmente há apenas uma via bem caracterizada, que envolve a Duffy Binding Protein (DBP), proteína presente na região apical do merozoíto, e o receptor de quimiocinas de células humanas presente nos reticulócitos humanos (DARC – Duffy Antigen/Receptor for Chemokines). De interesse, recentemente, foi descrito que *P. vivax* invade, preferencialmente, reticulócitos jovens imaturos, ou seja, aqueles que expressam o receptor CD71 + (Malleret et al., 2015). Após inúmeras gerações de merozoítos, alguns se diferenciam em gametócitos femininos e masculinos, formas sexuadas do parasito que amadurecem sem sofrer divisão celular. Quando ingeridas pela fêmea do *Anopheles* durante repasto sanguíneo, dá-se início ao ciclo sexuado do parasito dentro do vetor invertebrado.

Já no mosquito, os gametócitos masculinos e femininos se diferenciam em gametas que, dentro do intestino médio, se fundem para a formação do zigoto. Horas depois, o agora denominado oocineto se desloca através de células epiteliais por movimentos ameboides a fim de se fixar entre o epitélio e a membrana basal. Uma vez fixado, o oocineto passa a se chamar oocisto e é quando se inicia o processo de multiplicação esporogônica. Em aproximadamente duas semanas, a parede do oocisto se rompe, liberando os esporozoítos que prontamente invadem a hemolinfa do mosquito. Através desta via, os esporozoítos migram até as glândulas salivares, completando o ciclo do *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado (Josling & Llinás, 2015).

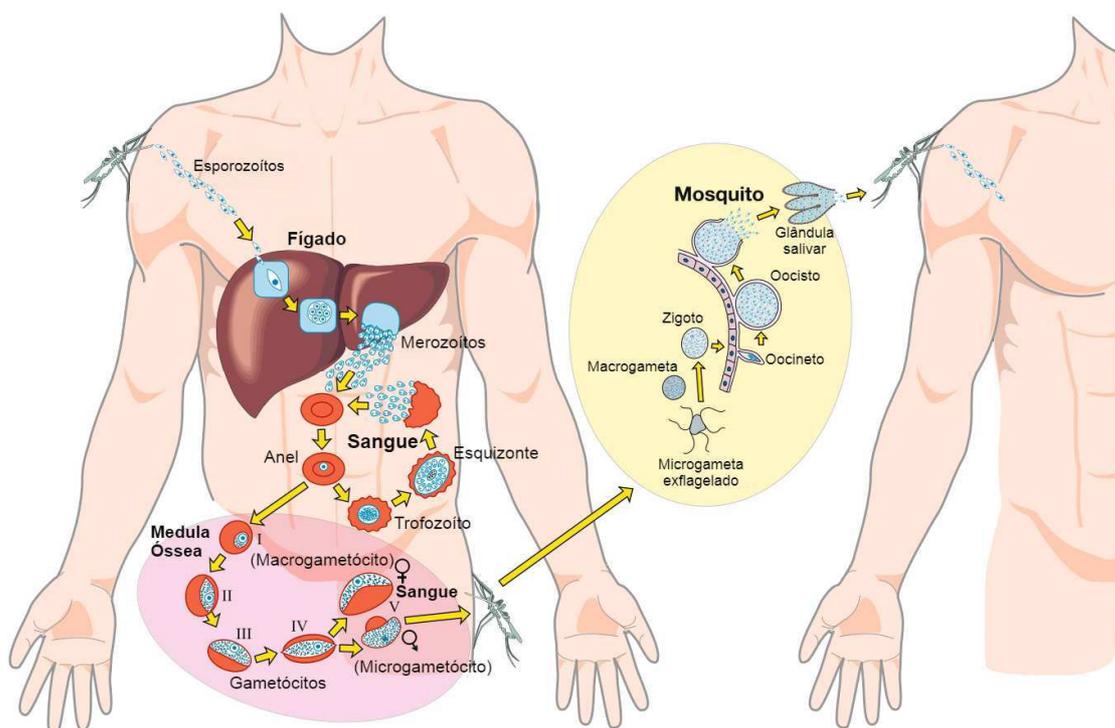


Figura 1: Representação esquemática do ciclo do Plasmodium no hospedeiro vertebrado humano (Adaptado de Karunajeewa & Mueller, 2016).

1.3 Imunidade naturalmente adquirida contra a malária

A imunidade naturalmente adquirida (INA) na malária protege mais contra os sintomas clínicos da doença do que contra a infecção propriamente dita. É sabido que INA se desenvolve depois de repetidas exposições e que indivíduos com histórico de longa exposição em áreas de elevada transmissão de malária têm maiores índices de aquisição dessa imunidade quando comparados a indivíduos residentes em áreas de baixa transmissão (Fowkes, Bouef, & Beeson, 2016). Geralmente, INA influencia não apenas na frequência de infecções maláricas, mas também na expressão de processos patológicos subjacentes às manifestações clínicas da infecção. Com base em inúmeros estudos, INA se define como a capacidade do hospedeiro de responder mais efetivamente durante uma segunda e/ou posteriores exposições ao patógeno quando comparada à exposição primária. No entanto, a qualidade e longevidade dessa resposta são altamente variáveis, dependendo, especialmente, do perfil de transmissão do local e também de fatores do hospedeiro, do parasito e do ambiente (Mueller et al., 2013).

Embora o sistema imunológico humano possa combater o parasito em todas as fases do seu ciclo de vida, a imunidade naturalmente adquirida parece ser mais

direcionada para o ciclo sanguíneo da doença. Especificamente em infecções por *P. vivax*, INA manifesta-se como proteção contra altas densidades parasitárias e contra a doença clínica. Enquanto crianças se tornam imunes à sintomatologia mais grave da doença após apenas algumas infecções sintomáticas (embora mantenham altos níveis de parasitemia), indivíduos adultos que vivem em área endêmica só desenvolvem imunidade aos sintomas após anos de repetidas infecções. Com a exposição acumulada, a imunidade à doença clínica é adquirida, conferindo ao indivíduo a capacidade de manter a parasitemia abaixo do limiar, prevenindo o aparecimento de sintomas (Healer et al., 2017). De forma geral, esse tipo de imunidade tem como características principais (i) os níveis mais elevados de INA ocorrem em áreas holoendêmicas, já que essa imunidade é dependente de exposição contínua e múltiplas infecções; (ii) INA é relativamente cepa-específica, especialmente se tratando de *P. vivax*, uma vez que os parasitos têm um potencial maior de diversidade resultante das recaídas por hipnozoítos. (Mueller et al., 2013). Com a recente introdução globalizada de medidas de controle para a malária, uma melhor compreensão de INA em condições de transmissão intermediárias e baixas é oportuna e importante para ajudar nos esforços que buscam a eliminação da doença.

1.3.1 Imunidade humoral naturalmente adquirida contra *P. vivax*

Na malária, anticorpos são conhecidos por contribuírem para a chamada imunidade naturalmente adquirida. Tal afirmação baseia-se em um estudo clássico realizado em 1961 que demonstrou que a transferência de soros de adultos imunes a *P. falciparum* para crianças, exercia um papel de proteção clínica contra posteriores eventuais infecções (Cohen et al., 1961). Posteriormente, na década de 90, estes estudos de transferência passiva foram confirmados (Sabchareon et al., 1991). As funções efetoras mediadas por anticorpos podem incluir a inibição da invasão dos eritrócitos (RBC), a neutralização, a opsonização, a inibição de células anticorpos dependentes e, ainda, a citotoxicidade de células mediada por anticorpos (ADCC). Enquanto a maior parte dos estudos de imunidade adquirida são realizados com ênfase em *P. falciparum*, estudos que investiguem os mecanismos relacionados à *P. vivax* fazem-se necessários (Revisto por Longley, Sattabongkot & Mueller, 2016).

Comparando as duas principais espécies, *P. falciparum* e *P. vivax*, estudos clínicos e imunoepidemiológicos têm demonstrado que a aquisição de imunidade clínica contra o *P. vivax* acontece mais precocemente do que para *P. falciparum* (Koepfli et al., 2013; Lin et al., 2010; Michon et al., 2007; Phimpraphi et al., 2008). A diferença na velocidade de aquisição dessa imunidade sugere que os mecanismos imunes protetores são divergentes entre estas espécies e coloca *P. vivax* a frente na possibilidade do desenvolvimento de uma vacina eficaz. Apesar disto, os estudos que investigam mecanismos protetores na malária vivax ainda são limitados; particularmente, devido a falta de bons modelos experimentais, já que ainda não se estabeleceu um sistema de cultivo contínuo das formas sanguíneas do parasito (Revisto por Tham; Beeson & Rayner, 2017). Como resultado, a maioria do que se sabe sobre mecanismos imunes envolvendo *P. vivax* são conceitos adaptados de outras espécies de *Plasmodium*, particularmente *P. falciparum*. Embora pareça razoável supor que os princípios fundamentais da imunidade contra *P. falciparum* também se apliquem a *P. vivax*, as diferenças significativas entre as duas espécies justificam cautela e deve-se atribuir importância e atenção aos mecanismos específicos que podem diferir entre elas. Para *P. falciparum*, a capacidade dos anticorpos de inibir diretamente a invasão dos merozoítos *in vitro* tem sido considerada como uma importante ferramenta para avaliar a atividade neutralizante de anticorpos (Persson et al., 2006). No caso do *P. vivax*, uma abordagem indireta tem sido o uso de ensaios que avaliam a capacidade de anticorpos de inibir a interação entre os ligantes do parasito expressos por transfecção e os receptores presentes na superfície de eritrócitos, particularmente o antígeno de grupo sanguíneo Duffy/receptor de quimiocinas (DARC). Tal abordagem tem a vantagem de não exigir o cultivo do parasito e fornecer dados sobre a atividade de anticorpos funcionais específicos para os antígenos (Souza-Silva et al., 2014; VanBuskirk et al., 2004). Comparando as duas principais espécies, *P. falciparum* e *P. vivax*, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a aquisição de imunidade para infecções clínicas por *P. vivax* acontece mais rapidamente do que para *P. falciparum* (Koepfli et al., 2013; Lin et al., 2010; Michon et al., 2007; Phimpraphi et al., 2008).

1.4 Longevidade da resposta imune humoral na malária

O desenvolvimento de uma vacina contra a malária mostra-se como um desafio devido à natureza complexa do parasito e à dificuldade em correlacionar respostas imunes naturalmente adquiridas com uma imunidade clínica. Embora a imunidade contra alguns sintomas clínicos graves possa ser alcançada com bastante rapidez, após uma ou duas infecções, mecanismos imunológicos efetivos capazes de controlar o crescimento dos parasitos só se desenvolvem após repetidas infecções ao longo de vários anos (Gupta et al., 1999). Ainda que com infecções repetidas, a imunidade contra a malária não é completa e infecções assintomáticas podem continuar acontecendo durante toda a vida. Entender as causas da susceptibilidade à infecção e, em particular, compreender o desenvolvimento e a manutenção da memória imunológica, é essencial para o desenvolvimento racional de vacinas contra a malária. É sabido que a reinfecção periódica é necessária para manter a imunidade adquirida e que os anticorpos antimaláricos são, em geral, de curta duração na ausência de reinfecção, implicando que as células B de memória para a malária tenham potencial aquém do desejável (não eficientes e/ou de curta duração) (Langhorne et al., 2008). No entanto, alguns estudos têm fornecido evidências da presença de anticorpos após longos períodos de exposição ao Plasmodium, sugerindo que a resposta humoral seja de longa duração (Fowkes et al., 2012; Wipasa et al., 2010). Os anticorpos produzidos em resposta a um novo antígeno usualmente são de baixa afinidade e secretados por células plasmáticas de curta duração, geradas após a interação entre células B naive e células T auxiliares. Uma vez que a infecção é controlada, a população de células T específicas ao antígeno e as células B de memória (MBCs) é reduzida a um pequeno número de células, que podem ser do tipo plasmáticas de vida longa ou B de memória (Revisto por Kurosaki et al., 2015). Estudos que avaliaram a presença de anticorpos contra antígenos pré-eritrocíticos e merozoíticos de Plasmodium falciparum demonstraram que houve diminuição e até desaparecimento dos anticorpos após o período transmissão/exposição ao parasito, no entanto, as MBCs foram mantidas por décadas (Ndungu et al., 2012). No que se refere ao Plasmodium vivax, nosso grupo de pesquisa em malária (BMIM/Fiocruz Minas) demonstrou a presença de MBCs antígeno-específicas detectadas cerca de 10 anos depois do contato com o parasito (Melo, 2016). Esses estudos preliminares fornecem evidências da existência de

MBCs de vida longa, detectadas anos depois da exposição, sugerindo que as respostas de MBCs possam ser geradas e mantidas independentemente de reexposição ou estimulação frequente pelo parasito. A partir disso, a avaliação de células B de memória na malária por *P. vivax* se faz de extrema importância, uma vez que determinar a longevidade na ausência de um reforço imunológico será importante para áreas com baixos e instáveis níveis de transmissão da doença, como é o caso da Amazônia brasileira. O parasito de *P. vivax* possui mais de 5000 proteínas identificadas e embora inúmeras delas tenham sido selecionadas como possíveis candidatas vacinais, as proteínas envolvidas no ciclo pré-eritrocítico e eritrocítico são as mais bem caracterizadas até o momento (King et al., 2008; Nicolette et al., 2016).

1.5 Principais antígenos candidatos à vacina de *P. vivax*

Nas últimas décadas, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de vacinas contra diferentes estágios evolutivos de *P. vivax*. Assim, uma vacina bloqueadora da transmissão – isto é, aquela cujo alvo são estágios do parasito que evoluem no mosquito vetor – poderia garantir a interrupção da transmissão e evitaria a reintrodução da doença em áreas onde a eliminação já foi alcançada (Mueller et al., 2015). Por outro lado, uma vacina contra a fase pré-eritrocítica não só poderia prevenir a infecção sanguínea, mas também evitaria o estabelecimento de hipnozoítos, reduzindo assim o número de recaídas, conhecidas por contribuir para a manutenção da transmissão da doença. Por último, uma vacina contra os estágios sanguíneos, responsáveis pela doença clínica, reduziria consideravelmente a parasitemia e a gametocitomia associada, interferindo também no potencial de transmissão.

1.5.1 Antígenos envolvidos no bloqueio da transmissão do parasito pelo mosquito vetor

Além de alvos clássicos que fazem parte da biologia do parasito, metodologias alternativas para tentar alcançar o controle da infecção por malária vêm sendo testadas. Algumas delas buscam uma vacina que bloqueie diretamente a transmissão do parasito através de estratégias que previnam seu desenvolvimento no mosquito vetor (Revisto por López et al., 2017). Até o momento, a busca de alvos adequados para uma vacina bloqueadora de transmissão (VBT) tem se mostrado

promissora. Entre os principais alvos, temos aqueles de bloqueio de fertilização (P230 e P48/45); os de bloqueio de invasão da glândula salivar (Saglin) e, por fim, os que bloqueiam a formação do oocisto (WARP, CTRP, SOAP, CeITos, APN1, Pvs25 e Pvs28). Estes dois últimos, em particular, têm sido considerados os melhores candidatos já que interferem diretamente tanto na maturação do oocineto, quanto na formação de oocistos (Wu et al., 2015). De fato, testes realizados com animais de laboratório demonstraram que anti-soros contra ambas as proteínas foram capazes de reconhecer antígenos e, ainda, suprimir significativamente o desenvolvimento de oocistos em quatro diferentes espécies de *Anopheles* (Chaurio et al., 2016; Hisaeda et al., 2000).

1.5.2 Antígenos envolvidos nos estágios pré-eritrocíticos

Sabe-se, há quatro décadas, que é possível induzir proteção total contra a malária utilizando parasitos inteiros (esporozoítos) atenuados (Nussenzweig et al., 1967). Entretanto, esta proteção é estágio-específica e dependente de altas doses de esporozoítos. De fato, estudos recentes confirmam estes dados e demonstram que 100% de proteção pode ser alcançada com elevadas doses de esporozoítos irradiados, seja através da picada de mosquitos infectados ou injeção intramuscular (Revisto por Hoffman et al., 2015). Ainda que realizado em *P. falciparum*, essa metodologia muito provavelmente será extrapolada para *P. vivax*. No entanto, apesar de parecer promissora, esse tipo de vacina requer grande investimento financeiro e não é considerada viável para uma vacinação em massa como, por exemplo, aquela requerida para proteger crianças expostas à malária na África. Neste contexto, as vacinas com subunidade são mais promissoras.

Entre as vacinas de subunidade contra antígenos pré-eritrocíticos temos, como alvo principal, a proteína circunsporozoíta de *P. vivax* (PvCS), que é a mais predominante na superfície de esporozoítos e desempenha um papel fundamental na invasão dos hepatócitos (Aldrich et al., 2012). Estudos realizados com a CS de *P. falciparum* (PfCS) demonstraram que é possível obter proteção parcial contra a malária causada por essa espécie uma vez que os anticorpos anti-CSP podem ser capazes de bloquear a invasão dos hepatócitos (Agnandji et al., 2015). Esse resultado tem incentivado o aprimoramento da vacina CS de *P. falciparum* bem como o desenvolvimento de uma vacina baseada na CS de *P. vivax*, uma vez que

essa proteína é homóloga nas diferentes espécies de plasmódios (Revisto por Partnership, 2015). De fato, estudos conduzidos por Yadava e colaboradores em 2014 demonstraram que um antígeno quimérico recombinante baseado na PvCS foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos em modelos experimentais. Entretanto, até o momento, não foi capaz de levar a uma imunidade estéril em nenhum dos voluntários vacinados (Yadava et al., 2014). Dado que CS tem sido amplamente modificada e estudada em diferente espécies de Plasmodium, esta proteína ainda é considerada como um alvo promissor para o desenvolvimento de vacinas contra P.vivax (Mueller; Shakri; Chitnis, 2015; Romero et al., 1987).

1.5.3 Antígenos envolvidos no estágio eritrocítico

Em se tratando do estágio sanguíneo, a proteína da superfície de merozoítos (MSP-1), abundantemente expressa na superfície de merozoítos, está fortemente associada à resposta imune humoral e celular naturalmente adquiridas. O fragmento C-terminal de 19 kDa (MSP₁₉) da proteína, produzido após sucessivas clivagens ao longo dos processos de esquizogonia sanguínea (MSP₁₉), é o antígeno mais bem mais estudado (Rocha et al., 2017). Alguns trabalhos demonstraram que este fragmento da proteína é capaz de induzir a produção de altos títulos de anticorpos e ainda levar à geração de células B de memória (Lin et al., 2010; Wipasa et al., 2010). A proteína também demonstrou ser um eficiente marcador de infecção e exposição, uma vez que grande maioria dos indivíduos infectados ou expostos à doença desenvolvem anticorpos contra ela (Ceravolo et al., 2009). Além da MSP-1, temos o antígeno apical de membrana (AMA-1), que é uma proteína transmembrana localizada nos micronemas do parasito presente em todas as espécies de Plasmodium. Dados de estudos realizados com roedores e primatas não humanos demonstraram que PvAMA-1 pode ser um alvo promissor para induzir resposta imune protetora. Há fortes evidências de que anticorpos contra essa molécula podem inibir a invasão dos parasitos nos eritrócitos de hospedeiros humanos. Além disso, estudos imunoepidemiológicos realizados em diferentes regiões do Brasil, Índia e Sri-Lanka demonstraram resposta imune naturalmente adquirida à PvAMA-1 mesmo em indivíduos com exposição limitada à doença (Bueno et al., 2011; Seth et al., 2010; Wickramarachchi et al., 2006). De modo geral, PvAMA-1 pode ser considerado, entre antígenos de estágio sanguíneo, um dos alvos para uma futura vacina de subunidade contra a malária por P. vivax (Revisto por Salavatifar et al.,

2015).

1.5.3.1 Duffy Binding Protein (DBP)

Atualmente, a PvDBP (Duffy Binding Protein de *Plasmodium vivax*) é considerada o antígeno mais promissor para uma vacina contra essa espécie, por participar da única via de invasão bem caracterizada. De relevância, ainda, anticorpos anti-PvDBPII parecem estar associados à proteção contra a doença clínica (King et al., 2008; Nicolette et al., 2016).

A DBP é a proteína ligante que *P. vivax* usa para invadir eritrócitos expressando o antígeno de grupo sanguíneo DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines). Contudo, recentemente, mostrou-se que essa interação pode não ser essencial para a invasão em algumas variantes uma vez que indivíduos DARC negativos (não expressam o receptor na superfície de suas células vermelhas) foram encontrados infectados por *P. vivax* (embora tais ocorrências sejam extremamente raras) (Cavasini et al., 2007; Menard et al., 2010). A DBP é uma proteína que faz parte de uma família de proteínas que se ligam aos eritrócitos (Duffy binding like/erythrocyte-binding protein/DBL-EBP) e é dividida em sete regiões distintas: a região I, que contém o peptídeo de sinal; um domínio rico em amino cisteínas conhecido como região II; uma região carboxiterminal conhecida como região III; três regiões hidrofílicas (IV,V e VI) e por fim um domínio transmembrana com um curto segmento citoplasmático (VII) (Figura 2A). Na região II dessa proteína, se encontra o ligante funcional que corresponde a um fragmento de cerca de 300 aminoácidos (Adams et al., 1992). Interessantemente, essa região é altamente polimórfica, um padrão consistente com a forte pressão seletiva exercida sobre a DBP II (Ntumngia et al., 2014; Sousa et al., 2010). Mais recentemente, foi demonstrado que a DBP II se dimeriza no momento da invasão e, apenas na forma dimérica se liga a duas moléculas de DARC (Figura 2B) (Batchelor et al., 2011).

Em 1997, Fraser e colaboradores demonstraram que indivíduos naturalmente infectados eram capazes de produzir anticorpos para a região II da DBP. Posteriormente, Michon e colaboradores (2000) comprovaram ainda que tais anticorpos eram também capazes de inibir a ligação entre a DBP II e os RBCs e que o nível de inibição correlacionava-se com a resposta de anticorpos, sugerindo que a

capacidade de produzir uma grande quantidade de anticorpos poderia resultar em uma imunidade protetora (Adams et al., 2000). Além disso, é sabido que existe associação entre o aumento de anticorpos anti-DBPII com a idade do indivíduo e com seu nível de exposição ao parasito (Cerávolo et al., 2005).

Embora essas respostas tenham sido identificadas em indivíduos infectados por *P. vivax*, uma proporção significativa de indivíduos expostos não é capaz de produzir anticorpos contra a DBP. Tal variabilidade de resposta pode ser devida a polimorfismos observados dentro da DBPII, que podem favorecer a evasão imune, ou devido a diferenças no genótipo de DARC (Cole-Tobian; King, 2003). Além de ser receptor para *P. vivax* e inúmeras quimiocinas, DARC tem uma importância clínica e biológica e é associado a incompatibilidades em transfusões e doenças hemolíticas em recém-nascidos. DARC é uma proteína de membrana glicosada codificada por cinco genótipos comuns que resultam em três fenótipos com diferentes expressões que fazem a suscetibilidade ao *P. vivax* variar entre os tipos (Maestre et al., 2010).

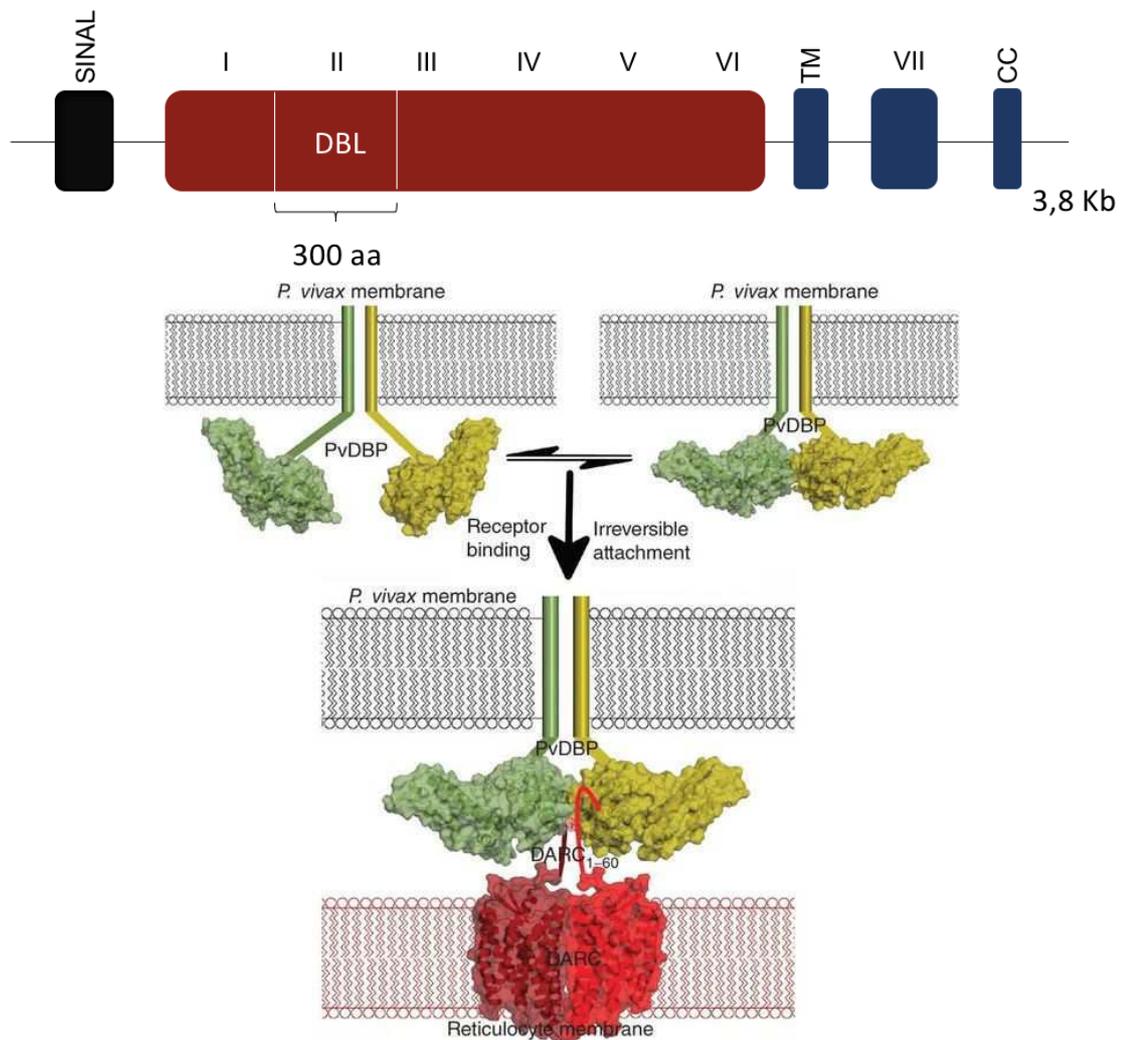


Figura 2: Representação esquemática de (A) domínios estruturais da Duffy Binding Protein de Plasmodium vivax (PvDBP) e (B) processo de dimerização entre duas moléculas de PvDBPII e duas moléculas de DARC, essencial para a invasão das células hospedeiras (Adaptado de Batchelor et al., 2011).

Ainda que promissor, o potencial da DBPII como antígeno vacinal é limitado uma vez que a proteção é, em geral, cepa-específica (Ceravolo et al., 2009) e a resposta humoral é de curta duração, reafirmando a necessidade do desenvolvimento de uma vacina focada em peptídeos sintéticos baseados em regiões conservadas, como é caso dos protótipos vacinais baseados na DBPII que vêm sendo desenvolvidos.

1.5.3.2 Antígenos vacinais baseados em epítomos conservados da DBP II

Nos últimos anos, diferentes epítomos na DBPII associados a anticorpos neutralizantes da infecção foram identificados, mas são, em sua maioria, polimórficos e, portanto, associados com uma imunidade cepa-específica. Estudos conduzidos por colaboradores utilizando anticorpos humanos naturalmente adquiridos, identificaram na DPBII um epítomo imunodominante de células B denominado DEK (Chootong et al., 2010). Tal epítomo, exposto na superfície sob forma de agrupamentos de resíduos polimórficos, parece não desempenhar papel funcional para o reconhecimento dos receptores, no entanto, flanqueia resíduos funcionais importantes para a ligação com o receptor.

A diversidade no domínio ligante representa um problema em potencial e pode comprometer a eficácia de uma vacina baseada na DBP II. Semelhante a outros ligantes microbianos, os alelos deste domínio alvo têm uma proporção alta de mutações não sinônimas para mutações sinônimas, refletindo um mecanismo consistente com uma alta pressão seletiva (Ntumngia & Adams, 2012). As infecções por *P. vivax* naturalmente adquiridas tendem a provocar anticorpos fracamente reativos e altamente cepa-específicos. Este fato tem sugerido que o epítomo polimórfico DEK representa, de fato, um mecanismo de evasão que direciona a resposta imune para longe das regiões mais conservadas, que seriam alvos potenciais para uma resposta imune (Chootong et al., 2010). O objetivo da imunização é acelerar a indução de uma imunidade protetora, mas a presença de epítomos variantes, como os existentes na região II de DBP, podem criar uma tendência inerente em direção a uma resposta específica e limitar a indução de respostas imunes direcionadas a epítomos mais conservados. Para superar essa limitação, variantes sintéticas da DBPII estão sendo desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do nosso colaborador – John H. Adams, South Florida University, Tampa, FL, USA. Nesses protótipos, denominados DEKnull, o epítomo polimórfico DEK foi removido objetivando um redirecionamento da resposta imune para epítomos neutralizantes mais conservados (Chootong et al., 2010; Ntumngia; Adams, 2012). Nesse contexto, a segunda geração desses protótipos, a DEKnull-2 (Figura 3), cujo os resíduos polimórficos não funcionais, isto é, que não tem papel fundamental no processo de invasão, foram removidos, tem demonstrado resultados iniciais promissores, tanto em estudos realizados em animais de laboratório como em

populações humanas naturalmente expostas à malária (Ntumngia et al., 2017).

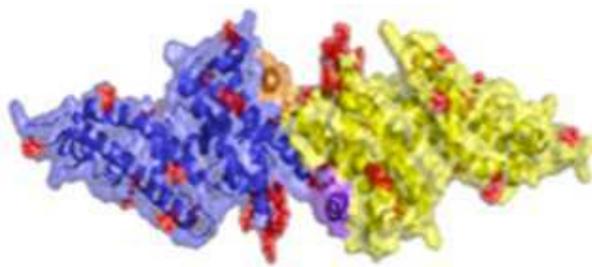


Figura 3: Representação esquemática do protótipo vacinal DEKnull-2. Em vermelho estão representados os epítomos polimórficos que foram removidos (Ntumngia et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços para o controle nas áreas endêmicas, a malária ainda representa um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo. O desafio de reduzir o impacto da doença nas populações acometidas fica ainda maior quando se leva em consideração a resistência dos parasitos aos fármacos disponíveis (Revisto por Ntumngia et al., 2015). Ainda que tenha ampla distribuição, a malária por *P. vivax* tem recebido pouca atenção quando comparada à malária por *P. falciparum*, que é a espécie responsável pela maioria das mortes causadas pela doença. No entanto, a crescente evidência da presença de cepas de *P. vivax* resistentes aos fármacos, a evolução de formas mais virulentas do parasito, sua ampla distribuição geográfica, a produção precoce de gametócitos bem como a formação de hipnozoítos com potencial para recidivas são motivos de preocupação com relação a essa espécie. Por esses motivos, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a doença se mostra de extrema importância de urgência (Riley e Stewart, 2013).

As vacinas são consideradas uma importante ferramenta no controle das doenças infecciosas (Ntumngia et al., 2015). Mais de 70 vacinas contra *P. falciparum* estão atualmente em desenvolvimento e cerca de 20 em fase de estudo clínico (Hamad et al., 2018; Laurens et al., 2017; Partnership, 2012; Walk et al., 2017). Infelizmente, os mesmos avanços não são observados com relação a *P. vivax*, já que as poucas abordagens vacinais que chegaram na fase ensaio clínico tiveram resultados insatisfatórios (Riley e Stewart, 2013). Atualmente, a DBP-II, proteína fundamental para a invasão dos reticulócitos, é considerada o principal alvo vacinal contra as formas sanguíneas de *P. vivax*. Neste contexto, trabalhos realizados pelo nosso grupo na Amazônia brasileira permitiram: (i) caracterizar os principais alelos de DBP-II circulantes na Amazônia e demonstrar que a recombinação genética desempenha um papel importante na diversidade haplotípica da DBP-II (Sousa et al., 2006, 2010); (ii) descrever pela primeira vez que os anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor (BIAbs DBP-II) são de curta duração e induzem imunidade alelo-específica (Ceravolo et al., 2009); (iii) demonstrar, através de estudos longitudinais, que o desenvolvimento de DBP-II BIAbs é influenciado pela variabilidade genética da população de estudo, incluindo o receptor DARC (De Sousa et al., 2014). De grande relevância, o grupo demonstrou ainda que (iv)

poucos indivíduos desenvolvem anticorpos inibitórios, mas uma vez adquiridos, a resposta é de longa duração e independe da cepa do parasito, caracterizando estes indivíduos como “respondedores de elite” (Ceravolo et al., 2009; Kano et al., 2016; Souza-Silva et al., 2014). Por esse motivo, a caracterização imunológica dos indivíduos incluídos neste grupo pode ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de uma memória imunológica de longa duração e, conseqüentemente, guiar o desenvolvimento de uma vacina que seja cepa-transcendente.

Baseando-se nos achados promissores de avaliação da resposta imune contra DBP II e seus antígenos sintéticos na Amazônia (Kano et al., 2016; Ntumngia et al., 2017), o presente trabalho avaliou se diferentes perfis de respondedores a DBP II, incluindo os chamados “respondedores de elite”, são capazes de montar uma resposta de células B de memória (MBCs) eficiente contra a DBP II e suas variantes, especialmente Deknull-2, de modo a validar seu potencial vacinal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Em indivíduos com histórico de longa exposição ao *Plasmodium vivax* na Amazônia brasileira, caracterizar a resposta imune humoral, com ênfase nas células B de memória (MBCs), específica para antígenos vacinais baseados na DPBII.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Determinar, na população de estudo, a frequência e persistência de anticorpos para diferentes construções da DBPII, incluindo a vacina sintética DEKnull-2;

3.2.2. Avaliar, na mesma população, a presença de células B de memória DBPII-específicas através de um ensaio otimizado de ELISPOT antígeno-específico;

3.2.3. Avaliar se a persistência e longevidade da resposta de anticorpos influencia no perfil da resposta de células B de memória antígeno-específica.

4. METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em um assentamento agrícola da região amazônica, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil (Figura 4). O perfil de transmissão de malária nesta área já foi descrito com detalhes anteriormente (Kano et al., 2012). Resumidamente, a população local, cerca de 700 indivíduos, vive da agricultura de subsistência e da pesca às margens de pequenos riachos. Com relação à moradia, o assentamento divide-se nos tipos (i) Ramal, representando residências localizadas ao longo de estradas não pavimentadas; (ii) Igarapé, onde a população, conhecida por ribeirinha, vive ao longo do rio Pardo com moradias localizadas próximas às margens. Apesar do *P. vivax* e *P. falciparum* serem transmitidos durante todo o ano, *P. vivax* é responsável por cerca de 90% dos casos de malária na região. Nesta área, inquéritos sorológicos anti-DBP_{II} consecutivos permitiram identificar diferentes perfis de respondedores, incluindo os respondedores persistentes (Kano et al., 2016; Souza-Silva et al., 2014).

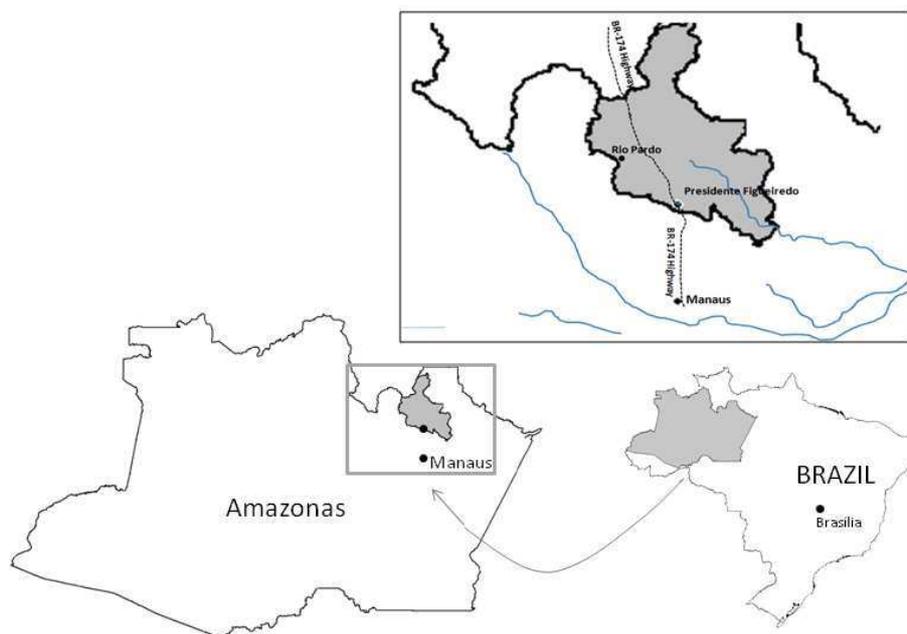


Figura 4: Mapa do estado do Amazonas, noroeste do Brasil, indicando a área de estudo. O assentamento do Rio Pardo está localizado no município de Presidente Figueiredo (área cinza na inserção), a cerca de 160 km da capital do estado, Manaus (Adaptado de Kano et al., 2016).

O grupo de Biologia Molecular e Imunologia da Malária (Instituto René Rachou/FIOCRUZ-MG) deu início a um estudo de base populacional na região em novembro de 2008, quando realizou a primeira coleta de amostras de sangue. Seis e doze meses depois do inquérito inicial, dois cortes transversais similares foram realizados (junho e novembro de 2009). Especificamente neste período de tempo, a incidência de malária na região confirmada por microscopia foi de 2,32 e 0,04 episódios para cada 100 pessoas/mês para *P. vivax* e *P. falciparum* respectivamente (Sousa et al., 2014). Seis anos depois, no ano de 2014, foi realizado um novo corte transversal (n=100), incluindo entrevista com questionário e coleta de amostras sanguíneas (plasmas e células mononucleares) e estas foram selecionadas para o presente estudo de avaliação de memória imunológica. Naquela ocasião, nenhum caso de malária aguda foi detectado na área (Figura 5).

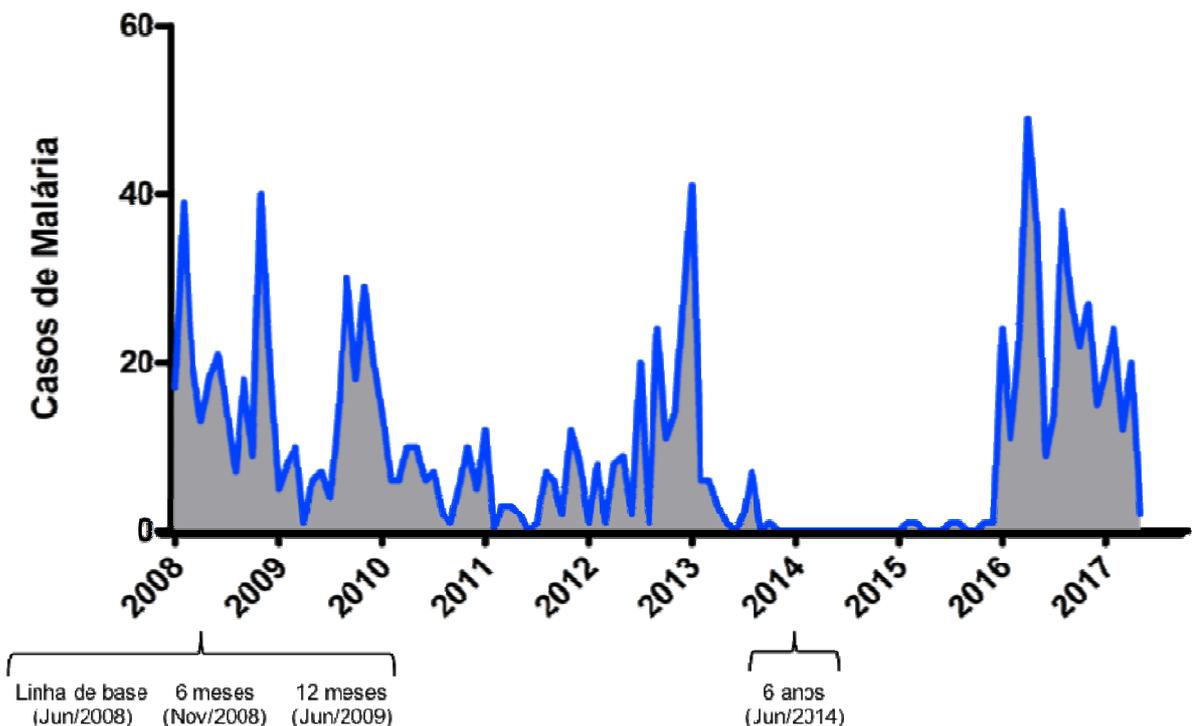


Figura 5: Casos de malária registrados pelo SIVEP (Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica) no assentamento agrícola de Rio Pardo/AM entre os anos de 2008 e 2017. A figura ilustra ainda os cortes transversais realizados no primeiro ano (linha de base, 6 e 12 meses) e depois de seis anos de acompanhamento.

No presente estudo, os critérios de inclusão dos voluntários no estudo foram (i) ter participado de todos os cortes transversais do estudo longitudinal até o ano de 2014 e (ii) ter disponibilidade de amostras biológicas (plasma e células mononucleares de sangue periférico) estocadas no biorepositório do BMIM (FioCruz

Minas) referentes ao quarto corte transversal (2014). Dessa forma, 42 dos 100 indivíduos que participaram do quarto corte transversal atenderam a esses critérios e foram selecionados para o estudo. Os indivíduos eram, em sua maioria, adultos (mediana: 42 anos), de ambos os sexos e com histórico de longa exposição à malária na Amazônia (mediana: 41 anos). As demais características epidemiológicas e demográficas dos indivíduos estão descritas na Tabela 1. Além de amostras de indivíduos originados de área endêmica (Rio Pardo/AM), também foram incluídos no estudo 9 indivíduos de área não endêmica (Belo Horizonte/MG) e nunca expostos à malária para servir de controle nos ensaios imunológicos.

Tabela 1: Características epidemiológicas e demográficas dos 42 indivíduos selecionados para o estudo.

Características – 4º corte (2014), n=42	
Mediana de idade, anos (IQR)	42 (30 – 53)
Gênero, masculino:feminino	1:1
Mediana de exposição à malária, anos (IQR)	41 (29 – 52,5)
Mediana do tempo de moradia em Rio Pardo, anos (IQR)	9,5 (5 – 13)
Local de moradia (%)	
Igarapé	59,5%
Ramal	40,5%
Número de episódios anteriores de malária, mediana (IQR)*	7 (3 – 15)
Malária referida/indivíduo, mediana (IQR)**	5 (3 – 15)

IQR: Intervalo interquartil

* Dados referentes ao período entre 2003 e 2017 (SIVEP)

** Número auto reportado de episódios prévios de malária

4.2 Proteínas recombinantes

4.2.1 Proteína de ligação ao antígeno Duffy, região II (Duffy Binding Protein II)

A proteína DBPII recombinante (variante DBPII Sal-1), correspondendo a região do ligante da DBP (região II, aminoácidos 243 a 573, 39kDa), foi produzida no Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária do IRR/Fiocruz, conforme protocolos bem estabelecidos e rotineiramente utilizados pelo grupo (Ntumngia et al., 2012; Sousa- Silva et al., 2014).

4.2.2. Construção de DEKnull-2

A proteína mutada DEKnull-2 (Ntumngia et al., 2017), que corresponde a região II da DBP (aminoácidos 243 a 573, 39Kda), foi produzida de acordo com o protocolo descrito por Ntumngia e colaboradores (2012). Basicamente, a sequência que codifica a região II da DBP da cepa referência Sal-1 (DBPII) foi utilizada como modelo para construção do protótipo DEKnull-2. Uma vez realizadas as modificações, a sequência codificadora foi clonada em plasmídeo (pET21a+, Novagen). O plasmídeo resultante foi transformado em E.coli BL21 (DE3) para expressão dos protótipos recombinantes, purificação dos corpos de inclusão e refolding. As proteínas foram produzidas pela Dra. Camilla Pires (BMIM, IRR/Fiocruz), durante seu pós-doutorado no laboratório do nosso colaborador Dr. John H. Adams (University of South Florida, Tampa, EUA).

4.3 Obtenção de plasma e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

Foram coletados cerca de 40mL de sangue em heparina sódica (tubos do tipo vacutainer, BD Vacutainer) por indivíduo. As amostras foram processadas no mesmo dia para obtenção de células mononucleares de sangue periférico. Dos 40mL de sangue heparinizado, 20mL foram diluídos em 10mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) incompleto (24 mM bicarbonato de sódio, 2mM L-glutamina, 25mM HEPES, 100U/ml penicilina e 0,017mM estreptomicina, pH 7,4), em tubo cônico de polipropileno de 50mL (tubo tipo Falcon). Em seguida, a suspensão sanguínea foi lentamente colocada sobre uma solução de histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), na proporção de 2:1 (tubo de 50mL), de modo a não romper a tensão superficial entre as duas camadas de densidades diferentes, e centrifugada (350 x g por 40min a temperatura ambiente). Após a centrifugação, o anel de PBMCs, localizado na interface entre o plasma e o histopaque, foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo tipo Falcon de 50mL já contendo meio de cultura RPMI 1640 incompleto. Para a obtenção do plasma, o volume restante do sangue total (20 mL) foi processado nas mesmas condições acima, porém sem ser diluído com meio de cultura, sendo o sobrenadante coletado e o plasma estocado até uso (-20°C). Após a lavagem (350 x g por 10min a 4°C, 3x), as células foram ressuspensas em soro bovino fetal (Gibco), contadas em câmara de

Neubauer e diluídas para uma concentração de 1×10^7 células/mL em soro bovino fetal suplementado com 10% de dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma-Aldrich). A suspensão de PBMCs (1×10^7 células/mL por crio-tubo, cryopure, Sarstedt) foi congelada lentamente, inicialmente a -80°C por 24h, com ajuda de recipiente para congelamento contendo isopropanol (Nalgene) e, posteriormente, a -196°C , sendo mantidas em nitrogênio líquido até uso.

4.4 Ensaios sorológicos

A presença de anticorpos IgG contra as proteínas desse estudo (DBPII Sal-1 e DEKnull-2) foi determinada através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) convencional e, posteriormente, avaliados para presença de anticorpos inibitórios de ligação DARC – DBPII (BIAbs) através do Ensaio Funcional de Ligação.

4.4.1 Ensaio sorológico convencional de ELISA para detecção de anticorpos IgG

A detecção de anticorpos anti-Sal-1 e anti-DEKnull-2 foi realizada conforme protocolos bem estabelecidos pelo grupo (Ceravolo et al., 2008; Cerávolo et al., 2005). Resumidamente, as placas foram sensibilizadas com os antígenos de interesse na concentração de $3\mu\text{g/mL}$ (DBPII Sal-1 e DEKnull-2) e, posteriormente, bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS 1x pH 7,2 + 0,05% Tween 20 + 5% leite em pó desnatado) por 1h. Em seguida, amostras de plasma dos indivíduos (diluídas a 1:100) foram incubadas e, após esse período, as placas foram lavadas e reveladas. As proteínas DBPII Sal-1 e DEKnull-2 foram produzidas fusionadas à cauda de poli-histidina (6xHis). O cálculo do ponto de corte (cut off) para cada proteína é calculado utilizando a média da DO490nm de 30 plasmas de indivíduos negativos (oriundos de área não endêmica) mais três vezes o desvio padrão. O cut off estabelecido para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 foi de 0,100.

4.4.2 Transfecção de células COS-7 e Ensaio Funcional de Ligação

Os ensaios funcionais para a detecção de anticorpos capazes de bloquear a interação DBPII-DARC são conduzidos conforme protocolos bem estabelecidos pelo grupo (Souza-Silva et al., 2014). Para tal, emprega-se uma linhagem de células de

mamíferos permissíveis à transfecção, COS-7, originalmente isolada a partir de células de rim de primata não humano africano, e modificada pelo vírus SV 40 (American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, VA). O plasmídeo utilizado para transfecção das células COS-7 foi construído previamente pelo nosso grupo de pesquisa e contém o gene da DBPII da variante de *P. vivax* mais frequente no Brasil – DBPII Brz1 (Souza-Silva et al., 2010). A célula transfectada é incubada com soro/plasma de pacientes e, posteriormente, inclui-se uma solução com 10% de eritrócitos humanos Duffy/DARC positivos. As rosetas formadas a partir da interação ligante-receptor foram quantificadas (10 campos/poço) em um microscópio de fluorescência invertido e com contraste de fase (200x) (Nikon, Melville, NY, USA). As rosetas somente são quantificadas quando eritrócitos aderentes cobrem mais que 50% de sua superfície celular (Michon et al., 2001). A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula $100 \times (R_c - R_t)/R_c$, onde R_c é a média do número de rosetas presente no controle e R_t a média do número de rosetas presentes nos soros-testes.

4.5 Ensaio imunoenzimático de ELISpot para detecção de células secretoras de anticorpo contra DBPII Sal-1 e o protótipo vacinal DEKnull-2

Os ensaios de ELISpot para células B foram realizados de acordo com protocolo descrito por Jahnmatz e colaboradores em 2013. A Figura 6 ilustra o esquema geral do ensaio. Basicamente as PBMCs foram removidas do nitrogênio e descongeladas imediatamente em banho maria a 37°C. Em seguida, as células foram adicionadas em tubo do tipo Falcon de 15 mL contendo 10 mL de RPMI 1640 completo (24 mM bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicilina e 0,017 mM estreptomicina, 10% SBF, pH 7,4) contendo 20 µg/mL da enzima Benzonase® nuclease (Sigma-Aldrich), para evitar aglutinação das células. As amostras foram centrifugadas (350 x g por 8 min a 4°C, 2x) para remoção do DMSO. Após descarte do sobrenadante e ressuspensão em RPMI 1640 completo, as células foram mantidas em gelo até que fosse realizada contagem no contador automático de células Countess (Invitrogen). Após contagem, as células foram diluídas em meio completo (RPMI 1640 10% SBF) e divididas em dois grupos: células submetidas a estímulo policlonal e células não submetidas a estímulo policlonal. Para diferenciação das células B de memória circulantes (MBCs) em

células B de memória secretoras de anticorpos (ASCs) foi realizado estímulo policlonal por 72 horas a 37°C utilizando o composto R848, um agonista de receptor do tipo toll 7/8 humano (Mabtech), e interleucina 2 humana recombinante (IL-2) (Mabtech). Então, distribuiu-se 500µL de células a 30×10^5 por poço seguido de 500µL de meio de cultura completo acrescido dos estímulos específicos naqueles poços correspondentes ao grupo de células com estímulo policlonal. Posteriormente, as placas de 96 poços para ELISpot (Merck millipore) foram sensibilizadas com anticorpo anti-IgG de captura MT91/145 (Mabtech) a 10µg/mL, para detecção das células secretoras de anticorpos (controle positivo) e 100µL de cada antígeno: PvDBP Sal 1 a 20µg/mL e Deknull-2 a 10µg/mL. As placas foram incubadas overnight a 4°C, lavadas cinco vezes com PBS 1x (137mM NaCl 2,68 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e, por fim, bloqueadas por 30 minutos com RPMI completo (temperatura ambiente).

A placa com as células, após 72 horas em cultivo, foi lavada em RPMI 1640 completo (350 x g por 10 min a 4°C) a fim de remover os anticorpos secretados. As células remanescentes foram ressuspensas em RPMI 1640 completo, transferidas para a placa de ELISpot previamente sensibilizada com os antígenos e incubadas overnight a 37°C, 5% CO₂. Após a incubação, as células foram descartadas e as placas lavadas com PBS 1x (5 vezes). Posteriormente, as células foram incubadas novamente por 2 horas com um anticorpo de detecção anti-IgG humana biotilado MT78/145 (Mabtech) a 1µg/mL (diluído em PBS 1x suplementado com 0,5% SBF). As placas foram novamente lavadas e incubadas 1h em temperatura ambiente com estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (ALP) (Mabtech) diluída 1:1000 em PBS 1x suplementado 0,5% SBF. O substrato para a enzima (BCIP/NBT, Mabtech) foi filtrado em filtro de 0,22µm, adicionado aos poços e incubado ao abrigo da luz em temperatura ambiente. O substrato foi mantido até que fossem observados os spots (cerca de 45 minutos). A reação foi interrompida com água corrente e as placas secas no escuro. A leitura dos spots foi feita manualmente com auxílio de um microscópio estereoscópio (aumento de 10x). O valor obtido na contagem dos spots por poço foi corrigido para 1×10^6 PBMCs e expresso como células secretoras de IgG (ASCs)/ 1×10^6 PBMCs. Adicionalmente, também foi calculada a porcentagem de células secretoras de IgG antígeno-específicas entre o total de células de secretoras de IgG. O cálculo do ponto de corte (cut off) para cada proteína foi calculado

utilizando a média de células secretoras de anticorpos por milhão (ASCs x 10⁶) dos indivíduos do grupo Persistente Não Respondedor mais 2 vezes o desvio padrão. O cut off estabelecido para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 foi de 18,5 e 12 ASCs/1x10⁶ respectivamente.

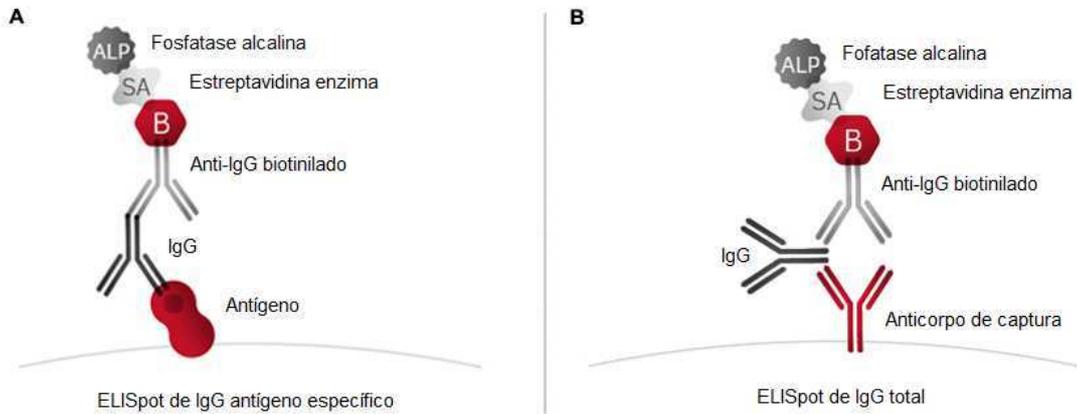


Figura 6: Ilustração esquemática do princípio do ensaio de ELISpot para (A) IgG antígeno-específico; (B) IgG total (adaptada de Mabtech). Disponível em <https://www.mabtech.com/knowledge-center/assay-principles/elispot-assay-principle/b-cell-elispot>. Acesso em janeiro de 2018.

4.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 7.0 (GraphPad software). A princípio, foram realizados os testes de Grubb, para detecção e remoção de eventuais outliers e o teste de Shapiro-Wilk para definir a distribuição dos dados. Uma vez definida a distribuição de dados (não gaussiana), foram realizados os testes de variância Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, dependendo do número de grupos analisados. O qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher foram utilizados para comparações de proporções entre os grupos. Para cálculos de taxa de episódios de malária, foi avaliada a densidade da incidência, calculada pela contribuição de cada indivíduo por tempo de acompanhamento no estudo (casos novos por 100 pessoas/mês). Em todos os casos, foram considerados significativos valores de $p < 0,05$ (nível de significância de 5%).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil sorológico para DBP_{II} Sal-1 e DEKnull-2 durante o estudo longitudinal (2008 – 2014)

No presente estudo, avaliou-se a presença e persistência da resposta de anticorpos IgG específicos totais (DBP_{II} Sal-1 e DEKnull-2) bem como dos chamados anticorpos funcionais, isto é, aqueles capazes de inibir a interação ligante-receptor (BIAbs). Para tal, amostras plasmáticas dos 42 indivíduos estudados foram avaliadas pela sorologia convencional (ELISA) e pelo ensaio funcional (COS-7 expressando DBP_{II}) em quatro cortes-transversais (linha de base, 6 meses, 12 meses e 6 anos do início do estudo) (Figura 7).

Durante o primeiro ano de estudo, as frequências de anticorpos detectados pelo ELISA contra a DBP_{II} Sal-1 ou DEKnull-2 foram similares, variando de 41 – 45% (Sal1) a 48 – 50% (DEKnull-2) (Figura 7A). Seis anos depois, enquanto a resposta a DEKnull-2 se manteve estável (55%) ($p=0,90$, $\chi^2=0,57$), observou-se uma diminuição aparente na frequência de respondedores para a DBP_{II} Sal-1 (28%), embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p=0,44$, $\chi^2=2,70$). De relevância, embora não se tenha observado diferenças significativas entre as frequências de resposta de anticorpos anti-DBP_{II} Sal1 ou anti-DEKnull2 ($p=0,18$, teste exato de Fischer), os níveis destes anticorpos foram diferentes para os dois antígenos estudados. Mais especificamente, independente do corte-transversal analisado, os índices de reatividade de DEKnull-2 (avaliado pelas medianas) foram significativamente maiores que aqueles obtidos para a DBP_{II} Sal-1 ($p=0,01$, teste t de student) (dados não mostrados).

Com relação a resposta de anticorpos inibidores da interação DARC-DBP_{II} (BIAbs), a Figura 7B demonstra que a frequência de BIAbs foi de 40% (17/42), 38% (16 /42), 31% (13 /42) e 48% (20/42) na linha de base, 6 meses, 12 meses e 6 anos, respectivamente. Portanto, assim como os anticorpos detectados pela sorologia convencional, a resposta de BIAbs também se manteve estável durante os 6 anos do estudo longitudinal ($p=0,47$, $\chi^2=2,50$). Em geral, indivíduos com resposta de anticorpos estável pelo ELISA (DBP_{II} Sal 1 ou DEKnull-2) também apresentaram perfil similar de anticorpos inibitórios.

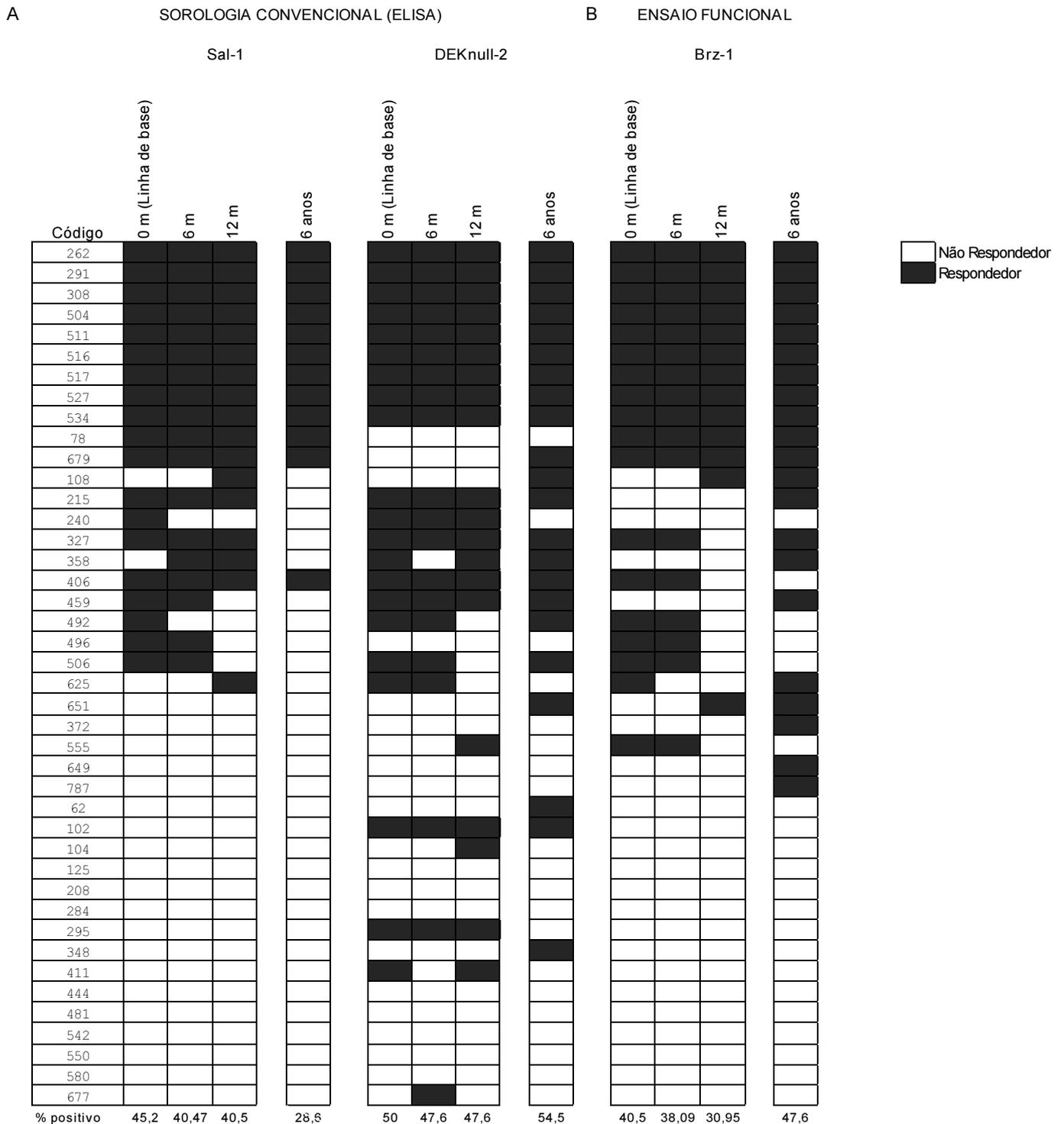


Figura 7: Resposta de anticorpos contra a Duffy binding protein (DBPII Sal-1) e seu protótipo vacinal DEKnull2 de *P. vivax* em 42 residentes de um assentamento agrícola da Amazônia brasileira (Rio Pardo – AM) acompanhados por 6 anos (2008 – 2014). (A) resposta de anticorpos contra DBPII-Sal-1 e DEKnull-2 avaliados pelo ELISA nos tempos 0 meses (linha de base), 6 meses, 12 meses e 6 anos (2014); (B) Resposta de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs) detectados mesmo período pelo ensaio funcional com linhagem celular COS-7; Pelo ELISA foram considerados respondedores (em preto), indivíduos que tiveram índice de reatividade (IR) > 1.0 e > 0,4 para DBPII Sal-1. Foram considerados respondedores (em preto) no ensaio funcional com COS-7, aqueles cuja a inibição de interação foi igual ou superior a 50%. A frequência de positividade (%) para cada variante pelos respectivos ensaios sorológicos estão indicadas na parte inferior da figura.

5.2 Categorização dos indivíduos do estudo de acordo com o perfil da resposta de anticorpos inibidores de ligação DARC – DBP II (BIAbs)

Com base nos dados da resposta de BIAbs, os indivíduos foram classificados em três grupos distintos de acordo com seu perfil de resposta contra DBP II: (i) Respondedor de Elite (RE), aqueles com anticorpos inibitórios durante todo o estudo (n=11, 26%); (ii) Respondedor Transiente (RT), cuja a atividade inibitória flutuou ao longo do tempo (n=15, 36%); ; (iii) Persistente Não Respondedor (PNR), aqueles que em nenhum momento do estudo apresentaram BIAbs (n=16, 38%). A Figura 8 ilustra o perfil de anticorpos inibitórios de cada um destes grupos. De forma interessante, uma proporção significativa dos indivíduos do grupo Respondedor de Elite (6/11, 55%), apresentaram uma resposta inibitória de ligação superior a 80% durante todo o período do estudo, demonstrando elevada capacidade de inibição da interação ligante-receptor.

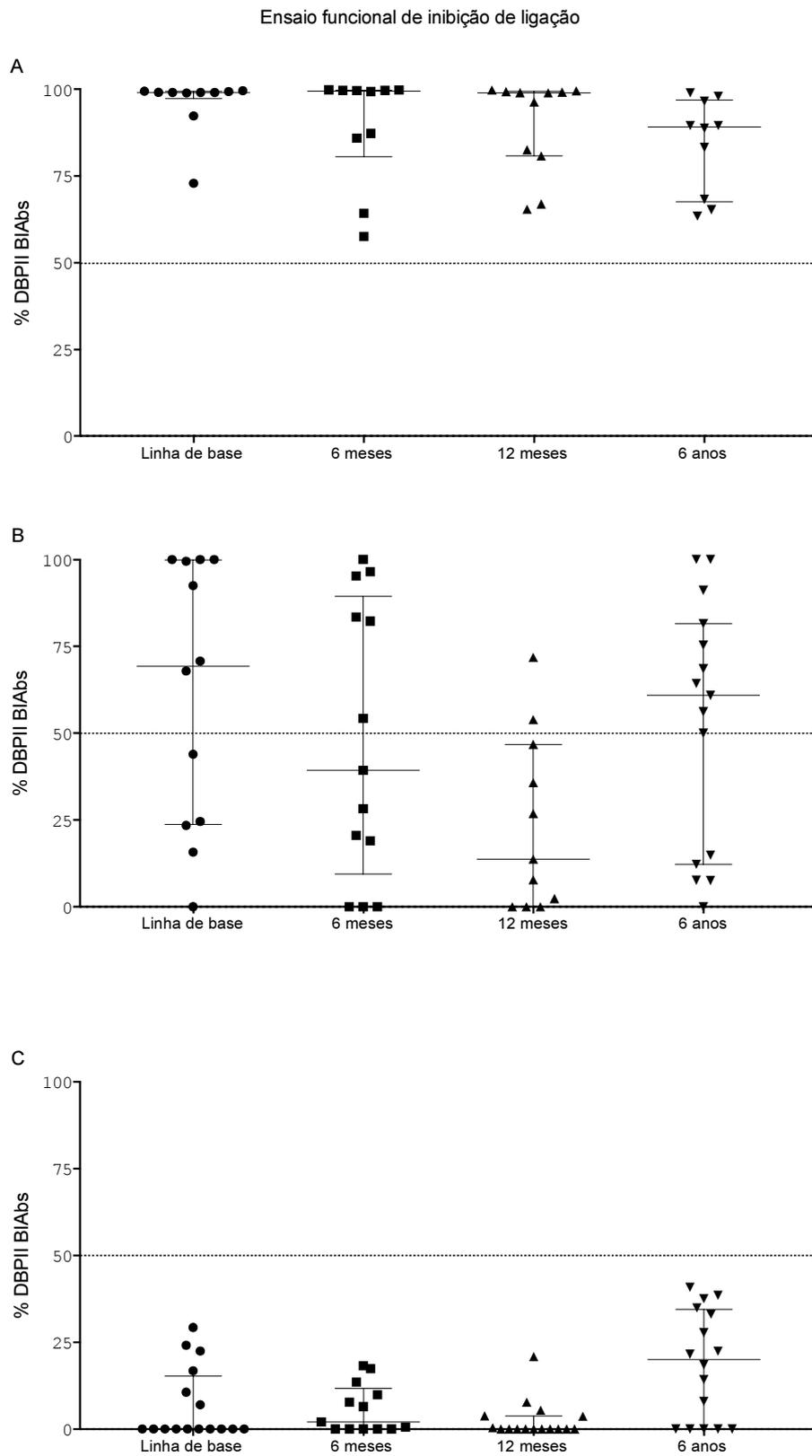


Figura 8: Perfil da resposta de anticorpos inibitórios da interação DBPII-DARC em seis anos de acompanhamento (linha de base, 6 meses, 12 meses e 6 anos – 2008-2014). (A) Respondedores de Elite (n=11), (B) Respondedor Transiente (n=15) e (C) Persistente Não Respondedor (n=16). Os dados foram expressos em percentagem de inibição da interação DBPII-DARC pelo ensaio funcional com COS-7. Foram considerados respondedores, percentagem maior ou igual a 50%.

5.3 Local de residência como variável associada ao perfil dos grupos com anticorpos inibitórios (RE, RT e PNR)

Na área de estudo, o local de residência parece estar associado ao maior risco de exposição à transmissão de malária. Desta maneira, avaliou-se se a proximidade das habitações aos criadouros de mosquitos (população de Igarapé) poderia estar influenciando no perfil de resposta de anticorpos inibitórios (RE, RT e PNR). De fato, 91% (10/11) dos indivíduos classificados no grupo Respondedor de Elite são residentes da localidade denominada Igarapé, isto é, vivem ao longo de cursos d'água (Figura 9A). Já no grupo Respondedor Transiente, a frequência de indivíduos nos Igarapés foi de 60% (Figura 9B) e de apenas 37,5% no grupo Persistente Não Respondedor (PNR) (Figura 9C). Nos dois primeiros grupos, a frequência de indivíduos residindo em áreas próximas aos cursos d'água foi significativamente maior quando comparados ao último ($p=0,02$, $\chi^2=7,7$, Qui-quadrado). Outras variáveis associadas a exposição, tais como idade e tempo de moradia na Amazônia não foram estatisticamente significativas entre os grupos (dados não mostrados).

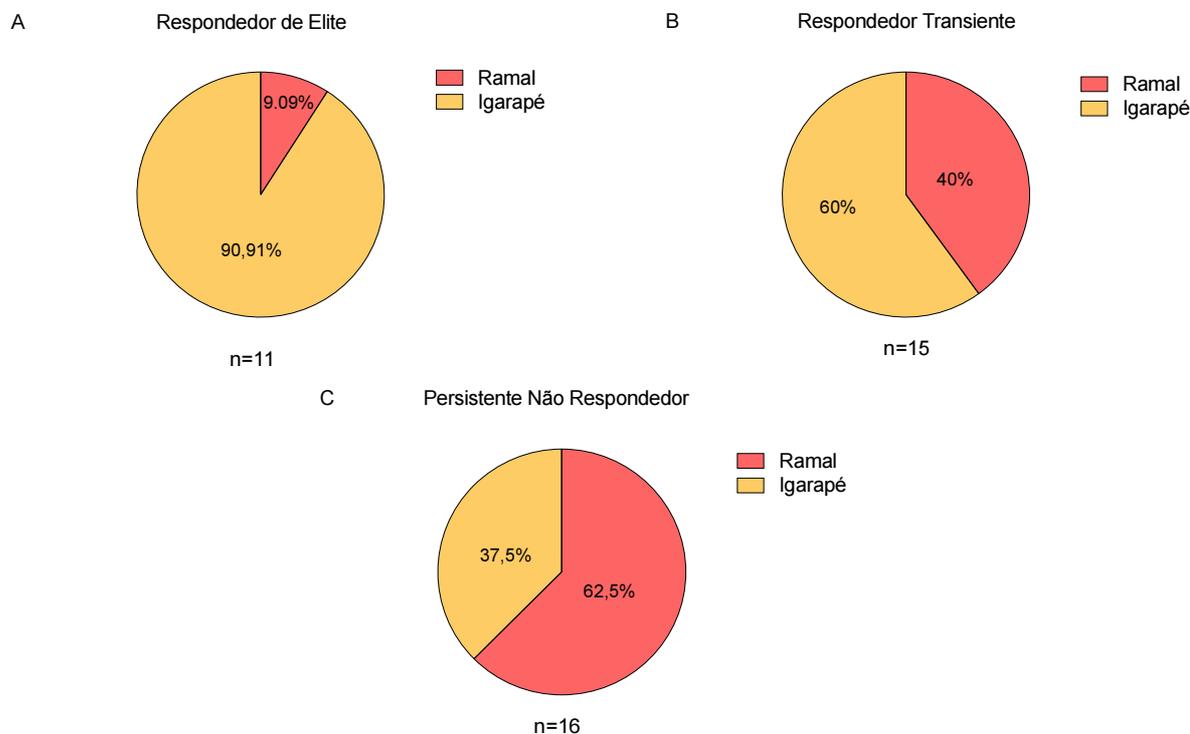


Figura 9: Influência do local de moradia dos indivíduos no perfil da resposta de BIAs contra a DBPII. (A) Respondedor de Elite; (B) Respondedor Transiente; (C) Persistente Não Respondedor. A cor amarela representa os indivíduos residentes às margens de pequenos cursos d'água da Amazônia, denominados Igarapé, e a cor alaranjada, os residentes ao longo de vias não pavimentadas na floresta (Ramais). A comparação entre as frequências foi realizada através do teste de qui-quadrado com significância avaliada para $p < 0,05$.

5.4 Incidência de infecção por *P. vivax* entre os grupos com diferentes perfis de resposta de anticorpos inibitórios (RE, RT e PNR)

A distribuição de casos de malária – avaliada aqui como infecção por 100 pessoas/mês – foi heterogênea entre os grupos estudados, sendo mais frequente entre aqueles indivíduos classificados no grupo Respondedor de Elite. Como ilustrado na tabela 2, o número de episódios por pessoa/mês foi de (i) 5,9 (95% IC, 4,4 – 7,8) para o grupo Respondedor de Elite; (ii) 2,9 (95% IC, 2 – 4) para o Respondedor Transiente; e (iii) 2,7 (95% IC, 1,9 – 3,8) para o Persistente Não Respondedor. Em resumo, a incidência de malária foi cerca de 2 vezes maior entre os RE quando comparada aos outros dois grupos (RE vs. RT, $p=0,001$; RE vs. PNR, $p=0,0002$; RT vs. PNR, $p=0,4$, Teste exato de Mid-P^{*}).

Tabela 2: Incidência de malária entre os grupos Respondedor de Elite, Respondedor Transiente e Persistente Não Respondedor

Incidência de malária por <i>P. vivax</i> [*]				
Grupo	Pessoas/mês	n ^{**}	Índice (casos/100 pessoas – mês)	Intervalo de Confiança (95% CI) ^{***}
Respondedor de Elite	792	10	5,9	(4,4 – 7,8)
Respondedor Transiente	1080	11	2,9	(2 – 4)
Persistente Não-Respondedor	1152	9	2,7	(1,9 – 3,8)

* A incidência anual de malária foi calculada baseada no número de casos com relação ao tempo de contribuição (em meses) de cada indivíduo ao longo do estudo (72 meses)

** Número total de indivíduos infectados por *P. vivax* registrados no Serviço de Vigilância em Saúde (SIVEP)

*** Foi considerado significativo valor de $p>0,017$ (correção de Bonferroni para valor de p)

5.5 Células B de memória antígeno-específicas em indivíduos com histórico de longa exposição à malária por *P. vivax*

Com o objetivo de avaliar a resposta de MBCs antígeno-específicas para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 nos indivíduos estudados, foram realizados ensaios imunoenzimáticos de ELISpot, capazes de detectar células secretoras de anticorpos IgG (ASCs) antígeno específicas para cada proteína. Para isso, os ensaios foram realizados no sexto ano de acompanhamento (2014), utilizando células mononucleares periféricas (PBMCs) dos indivíduos classificados como RE, RT ou PNR. Como controle negativo, foram incluídas nos ensaios PBMCs obtidas de indivíduos residentes em Belo Horizonte (n=9), que nunca tinham sido expostos a transmissão de malária. A figura 10 ilustra o número total de células secretoras de anticorpos (ASCs 1×10^6) no grupo de indivíduos expostos à malária (n=42, Rio Pardo, AM) e o grupo controle de Belo Horizonte. Como esperado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle (p=0,22, Mann-Whitney).

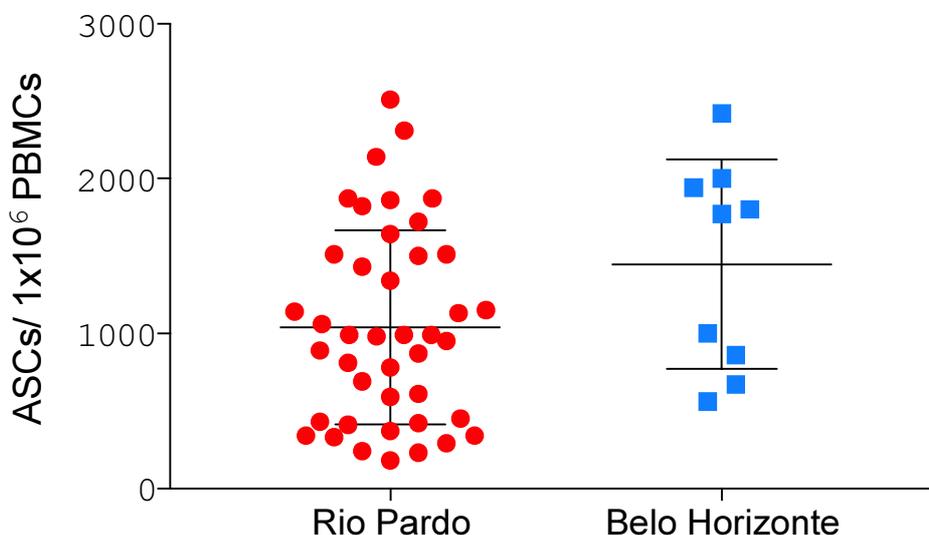


Figura 10: Resposta de células totais secretoras de anticorpos IgG em indivíduos expostos à malária (n=42, Rio Pardo, AM) versus indivíduos nunca expostos (Belo Horizonte, n=9). Os resultados estão expressos em células secretoras de anticorpos (ASCs) por milhão de PBMCs (1×10^6).

Para confirmar se o perfil de resposta antígeno-específica diferia entre o grupo expostos à malária (Rio Pardo, AM) e dos indivíduos não expostos (controle/Belo Horizonte), avaliou-se a frequência relativa de células secretoras de anticorpos (ASCs) antígeno-específicas (DBPII Sal-1 e DEKnull2) em relação ao

número total de ASCs. Se tratando de DBPII Sal-1, os indivíduos de Rio Pardo (AM) e Belo Horizonte apresentaram, respectivamente, uma mediana de frequência de resposta antígeno-específica de 0,1 e 0 (Figura 11A) ($p=0,12$, Mann-Whitney). Já para DEKnull-2, as medianas foram de 0,2 (Rio Pardo) e 0 (Belo Horizonte) (Figura 11B). Neste caso, a diferença entre as duas populações foi estatisticamente significativa, confirmando a especificidade do ensaio ($p=0,02$, Mann-Whitney).

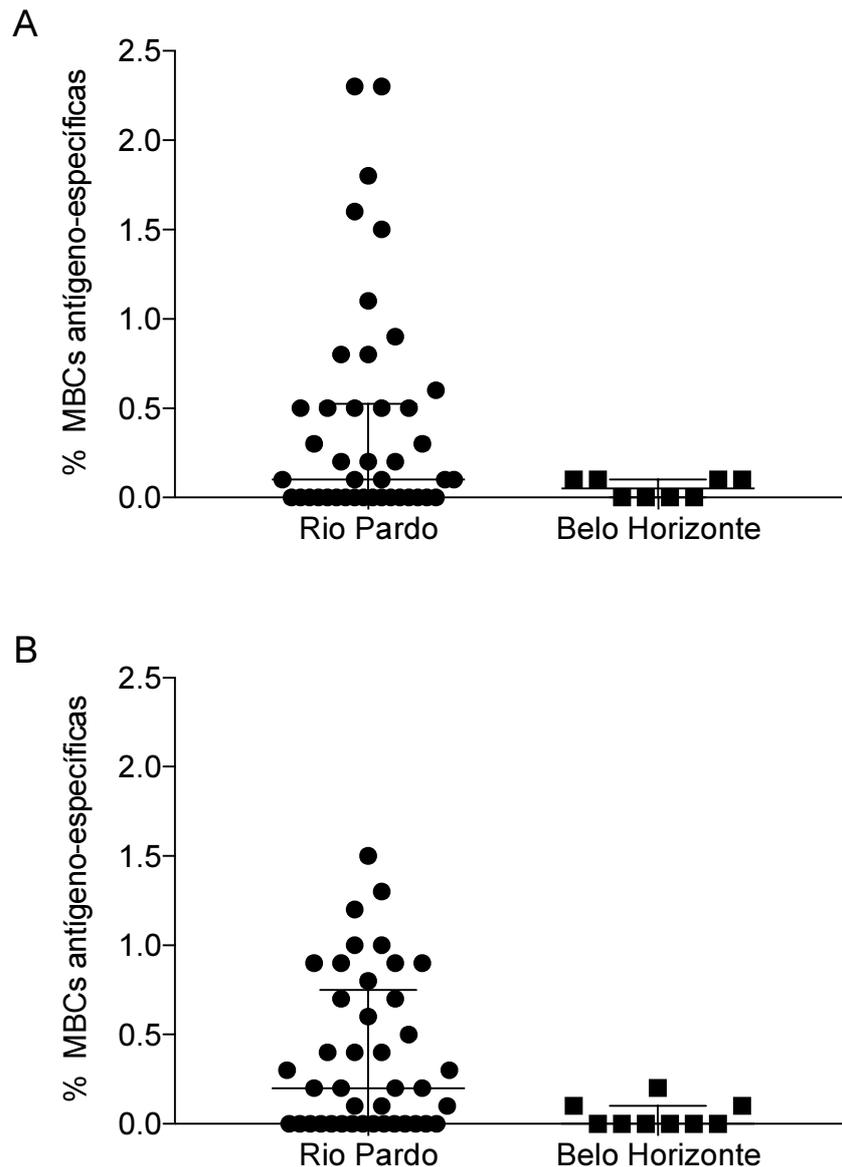


Figura 11: Frequência (%) de células secretoras de anticorpos (ASCs) antígeno-específicas para DBPII Sal-1 (A) e DEKnull-2 (B) em relação ao número total de células secretoras de anticorpos entre habitantes de área endêmica (Rio Pardo) e habitantes de área não endêmica/controles (Belo Horizonte). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste Mann-Whitney. Para fins estatísticos, os outliers, identificados pelo teste de Grubb, foram removidos da análise. O nível de significância considerado foi de 5% ($p<0,05$).

A figura 12 ilustra a resposta de células B de memória do tipo IgG antígeno-específicas para (A) DBPII Sal1 (A) e (B) DEKnull-2, sendo os resultados expressos em células secretoras de anticorpos antígeno-específicas por milhão de PBMCs (ASCs/ 1×10^6). Os resultados mostram que, entre os grupos respondedores (RE e RT), não houve diferença entre as medianas de resposta ($p=0,100$ para DBPII Sal-1 e DEKnull-2, Mann-Whitney). No entanto, quando comparados (RE e RT) com o grupo Persistente Não Responder (PNR), observa-se uma diferença estatisticamente significativa para ambas as proteínas ($p=0,0006$ e $p=0,0003$ para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 respectivamente, Mann-Whitney). Os resultados encontrados aqui sugerem ainda que DEKnull-2 parece ter sido mais imunogênica para o grupo RE quando comparada a DBPII Sal-1, embora a diferença entre elas não seja estatisticamente significativa ($p=0,48$, Mann-Whitney); especificamente, a mediana de resposta no grupo RE foi 15 vs. 5 para DEKnull-2 e DBPII Sal-1, respectivamente. Para os outros grupos, as medianas de intensidade de resposta foram similares entre as proteínas e, portanto, não estatisticamente significativas ($p=0,89$; $p=0,60$ para RT e PNR respectivamente, Mann-Whitney).

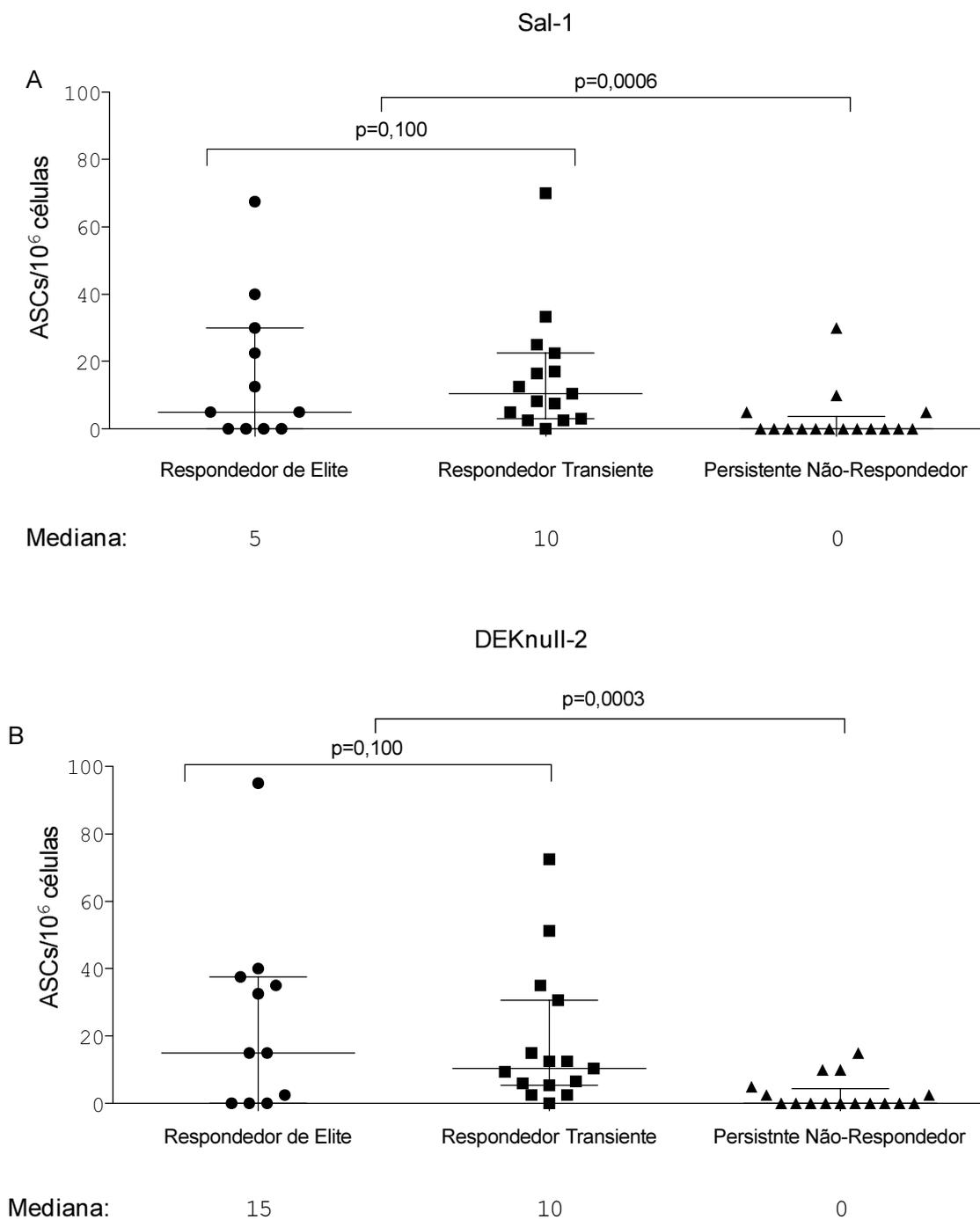


Figura 12: Resposta de células B de memória (MBCs) antígeno-específicas de indivíduos com distintos perfis da resposta de BIAbs para DBPII (Rio Pardo/AM), incluindo o grupo Responder de Elite (n=11); Responder Transiente (n=15); e Persistente Não Respondedor (n=16). (A) MBCs específicas para DBPII-Sal-1 e (B) MBCs específicas para DEKnull-2. Os resultados estão expressos em células secretoras de anticorpos (ASCs) por milhão (1×10^6). A comparação entre os grupos foi feita através do teste Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

5.5.1 Frequência de resposta de células B de memória antígeno-específica

A figura 13 ilustra o resultado individual para cada uma das proteínas estudadas nos diferentes grupos de respondedores. Foram considerados respondedores aqueles indivíduos cuja resposta foi igual ou superior a 18,5 ASCs/ 1×10^6 e 12 ASCs/ 1×10^6 para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 respectivamente (cutoff calculado com base na média de resposta do grupo Persistente Não Respondedor mais dois desvios-padrão). Dentre os 42 indivíduos incluídos no estudo, nos distintos grupos, 38% (16/42) apresentaram ASCs para uma ou ambas as proteínas. Em geral, a DEKnull-2 se mostrou mais imunogênica que a DBPII Sal-1. Especificamente, dentre aqueles que responderam, 50% (8/16) tiveram resposta positiva para DBPII Sal-1, 94% (15/16) responderam para DEKnull-2 (Figura 14A), sendo esta diferença de frequência de respondedores entre as proteínas estatisticamente significativa ($p=0,005$, $\chi^2=7,6$, Qui-quadrado).

A Figura 14B ilustra a frequência de resposta para cada proteína por grupo (RE, TR e PNR). Ao analisar cada grupo de forma singular, nos indivíduos considerados Respondedores de Elite, a frequência de resposta entre as proteínas foi de 36,4% e 63,4% para DBPII Sal-1 e DEKnull-2, respectivamente ($p=0,20$, $\chi^2=1,6$, Qui-quadrado). Já o grupo Respondedor Transiente apresenta um perfil de frequência de resposta de 26,7% e 46,7% de indivíduos respondedores para DBPII Sal-1 e DEKnull-2 ($p=0,25$, $\chi^2=1,3$, Qui-quadrado). Por fim, no grupo Persistente Não Respondedor, como esperado, encontramos uma frequência de resposta inferior quando comparada aos grupos anteriores, de 6% para ambas as proteínas (DBPII Sal-1 e DEKnull-2) ($p=0,10$, $\chi^2=0,10$, Qui-quadrado). Para todos os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa entre a resposta às proteínas, ainda que DEKnull-2 tenha apresentado frequência superior nos grupos respondedores (RE e RT) (Figura 14B).

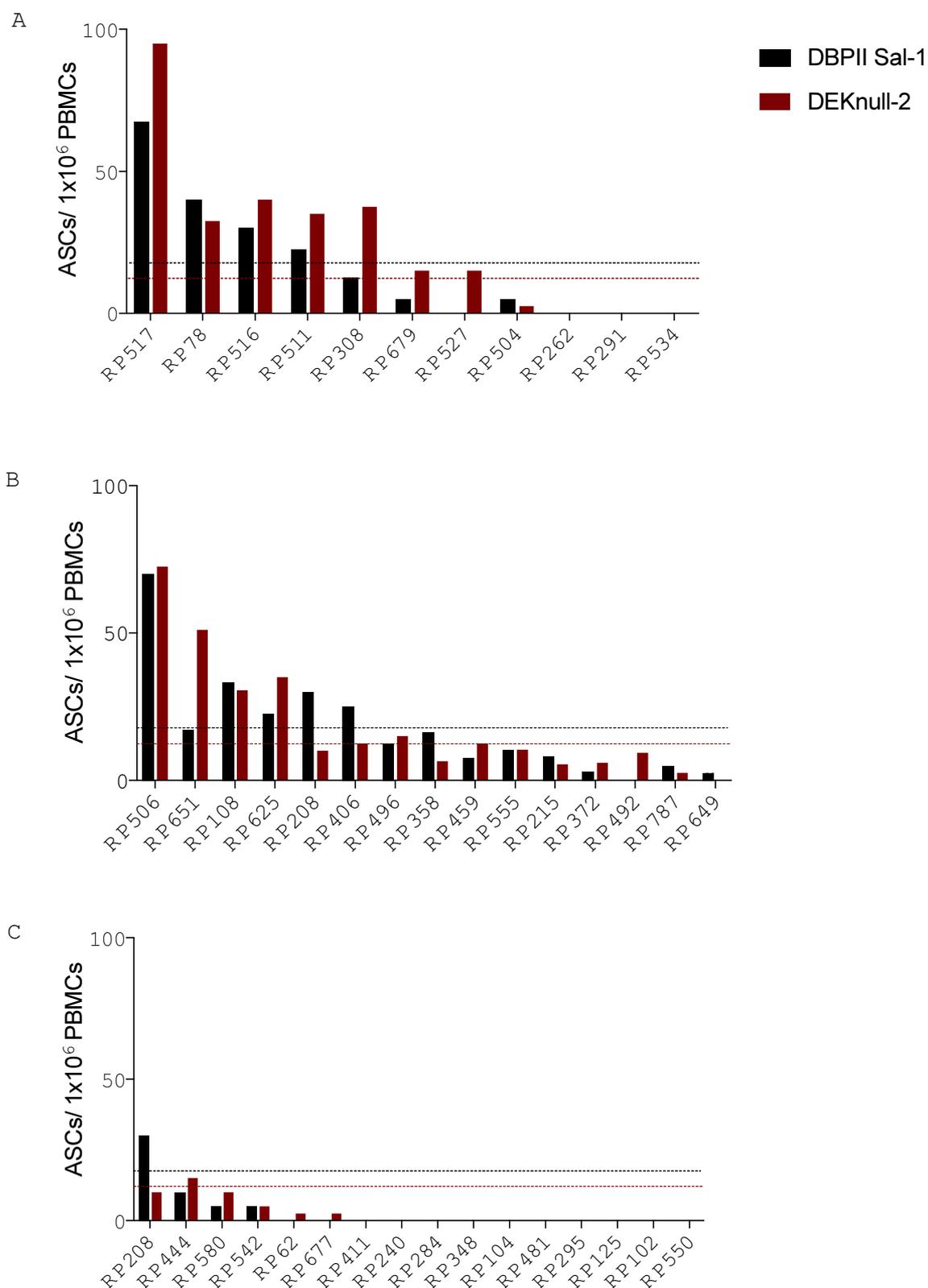


Figura 13: Número de células secretoras de anticorpos por indivíduo entre os grupos. (A) Respondedor de Elite; (B) Respondedor Transiente; (C) Persistente Não Respondedor. As proteínas avaliadas estão discriminadas pelas cores (i) preta, representando DBP II Sal-1 e (ii) vermelha, representando DEKnull-2. São considerados respondedores aqueles indivíduos cuja resposta foi maior que $18,5 \text{ ASCs}/1 \times 10^6$ (linha tracejada preta) e $12 \text{ ASCs}/1 \times 10^6$ (linha tracejada vermelha) para DBP II Sal-1 e DEKnull-2 respectivamente. A avaliação de frequência para os indivíduos que apresentaram células secretoras foi realizada através de Qui-quadrado.

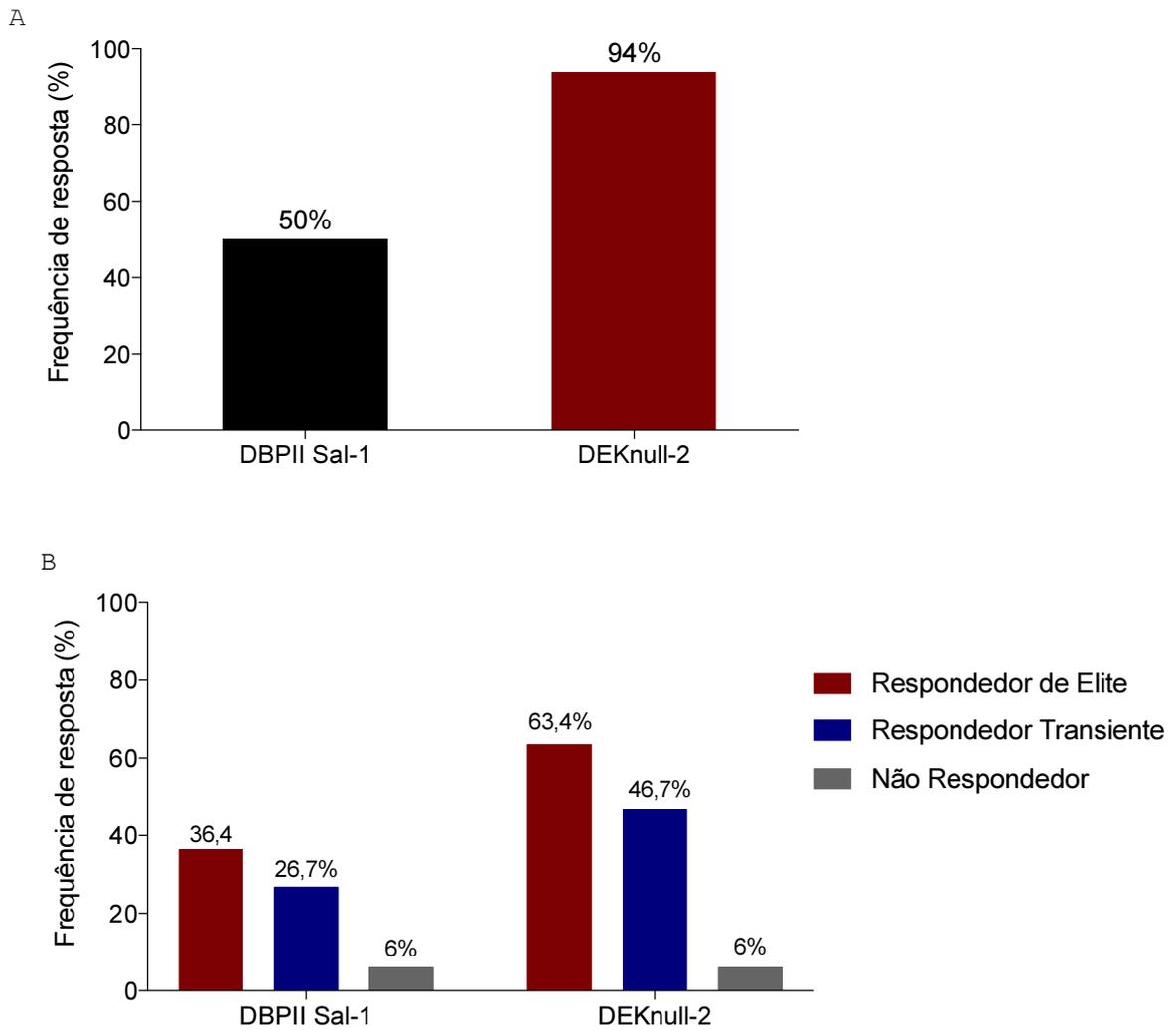


Figura 14: Frequência de resposta de células B de memória antígeno-específica para DBP II-Sal1 e DEKnull-2 em (A) Número total de indivíduos incluídos no estudo (n=42); (B) Indivíduos de grupos com perfil distinto de resposta de BIAs para DBP II. São considerados respondedores aqueles indivíduos cuja resposta foi maior que 18,5 e 12 ASCs/ 1×10^6 para DBP II Sal-1 e DEKnull-2 respectivamente. A comparação entre a proporção de respondedores para cada proteína entre os grupos foi avaliada pelo teste de qui-quadrado considerando nível de significância de 5%.

6 DISCUSSÃO

A homeostase da população de células B de memória e sua contribuição para a manutenção da memória imunológica permanece ainda pouco esclarecida (Amanna et al., 2008). Alguns estudos mostraram que determinados agentes patogênicos induzem memória vitalícia enquanto outros, por razões ainda desconhecidas, parecem induzir memória de curta duração (Amanna & Slifka, 2010). As células B de memória circulantes (MBCs) são responsáveis pela resposta rápida e potencialmente protetora, mediada por anticorpos, que é observada quando um determinado patógeno reinfecta um hospedeiro (Tangye & Tarlinton, 2009). Portanto, detectar essas células faz-se de extrema importância na avaliação da resposta de memória mediada por células B. A memória imunológica é a base para o desenvolvimento de vacinas efetivamente protetoras, que ainda não existem para a malária e outras doenças, como a tuberculose (Zinkernagel, 2003). De modo a atingir uma proteção de longa duração, a indução eficiente de MBCs pode garantir que as frequências de células B sejam suficientemente altas para manter os níveis de anticorpos protetores através de estimulação policlonal ou para induzir rapidamente a produção de anticorpos numa eventual reinfecção.

É altamente improvável que uma vacina contra a malária vá substituir as ferramentas de controle já existentes, ao menos que com esta vacina se obtenha uma imunidade estéril, de longa duração e cuja proteção seja espécie, estágio e cepa independente. Em vez disso, uma eventual vacina será parte integrante dos programas de controle da doença, que incluem acesso ao diagnóstico, tratamento oportuno e uso de mosquiteiros impregnados com inseticida (Revisto por Matuschewski, 2017). Ainda que complementar, uma vacina poderá ter grande papel na tarefa de eliminar a malária em determinadas regiões. Assim, fazem-se necessários estudos para avaliação da resposta humoral contra diversos antígenos candidatos vacinais, em especial aqueles que demonstram grande potencial imunogênico, como é o caso da construção sintética DEKnull-2, que visa induzir uma imunidade contra os estágios sanguíneos de *P. vivax* que independa da cepa do parasito (Ntumngia et al., 2017).

6.1 Longevidade da resposta imune humoral em indivíduos com histórico de exposição contínua à malária

Muitos estudos têm buscado investigar sobre a longevidade da resposta de anticorpos na malária (Longley et al., 2016). Tal questão tem sido amplamente debatida, com resultados que confirmam ou contestam a existência de resposta humoral de longa duração. Inúmeros estudos em áreas endêmicas para malária reforçam o dogma de que a resposta de anticorpos é relativamente de curta duração e declina rapidamente após o tratamento específico (Cavanagh et al., 1998; Perraut et al., 2000; Weiss et al., 2010). Esses estudos sugerem que é necessária uma exposição contínua para manutenção da resposta imune e que, em sua ausência, os anticorpos são de curta duração. De fato, no contexto de declínio de transmissão, diversos outros estudos demonstraram a queda no título de anticorpos específicos para o parasito (Aitken et al., 2010; Cook et al., 2011; Diop et al., 2014). Não está claro, no entanto, se o rápido declínio nas concentrações de anticorpos está relacionado com a eliminação do antígeno, como por exemplo, pelo tratamento antimalárico específico, ou está relacionado a uma limitação do sistema imune do hospedeiro; seja na medula óssea, onde as células plasmáticas de vida longa sobrevivem por longos períodos de tempo ou nos órgãos linfoides, com formação dos centros germinativos (MBCs de vida longa) (Revisto por Bayles & Milcarek, 2014). Todavia, grande parte desses estudos foram realizados na malária causada pelo *P. falciparum* que podem não refletir o que acontece na infecção por *P. vivax*, parasito biologicamente distinto do *P. falciparum*. Levando em consideração que o conhecimento acerca do desenvolvimento e manutenção da resposta imune humoral contra *P. vivax* ainda é incipiente, novos estudos fazem-se necessários.

No presente trabalho, avaliamos a resposta imune humoral (anticorpos e MBCs) de indivíduos com história de longa-exposição à malária em uma comunidade do Estado do Amazonas, assentamento agrícola de Rio Pardo, onde nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido um estudo prospectivo longitudinal (Kano et al., 2012, Sousa-Silva et al., 2014; Kano et al., 2016). Os indivíduos incluídos no presente estudo eram representativos da população de Rio Pardo, onde a idade (mediana de 42 anos) reflete o tempo de exposição à malária (mediana de 41 anos), particularmente, ao *P. vivax*, que nos últimos 10 anos tem predominado na região. Buscou-se aqui estudar duas proteínas relevantes do ponto de vista da

vacina contra o *P. vivax*: (i) a DBPII Sal-1, proteína apical do merozoíto envolvida na invasão do parasito e que induz imunidade cepa-específica (cepa Sal-1), conforme demonstramos anteriormente (Ceravolo et al., 2009); e (ii) a DEKnull-2, proteína sintética destinada a induzir resposta imune que transcenda a cepa do parasito (Ntumngia et al., 2017). O estudo abordou dois períodos distintos de transmissão de malária na área: entre 2008 e 2009 (3 cortes transversais, 12 meses de acompanhamento) quando a transmissão de *P. vivax* estava elevada (período de alta transmissão) e, em 2014 (4^o corte transversal), quando os níveis de transmissão estavam muito baixos (período de baixa transmissão) e nenhum caso agudo foi detectado (Torres, 2017). No que se refere a sorologia convencional (ELISA), os resultados demonstraram que no período de alta transmissão, cerca de 40-50% dos indivíduos responderam a DBPII Sal-1 ou a DEKnull-2, sendo esta resposta estável, pelo menos para a DEKnull2 (55%), durante o período de baixa transmissão (6 anos depois). Estes resultados confirmam o alto potencial da DEKnull-2 como imunógeno na Amazônia brasileira. De fato, independente do corte transversal, os níveis de reatividade da DEKnull-2 foram maiores que aqueles descritos para a DBPII Sal-1. Até o momento, nenhum outro protótipo vacinal baseado na DBPII se mostrou tão promissor. Isto confirma a hipótese inicial do grupo de pesquisa de que os polimorfismos presentes na DBPII desviam a resposta imune protetora dos epítomos conservados que são importantes para a proteção clínica (Ntumngia et al., 2012).

Como nem todo anticorpo contra a DBPII induz proteção, isto é, impedem a invasão da célula hospedeira, fez-se necessário avaliar a atividade funcional destes anticorpos sabidamente envolvidos na proteção clínica (King et al., 2008; Nicolette et al., 2016). Para tal, avaliou-se anticorpos capazes de bloquear a interação entre a DBPII e seu ligante presente na superfície dos eritrócitos. O ensaio utilizado aqui, que se baseia na expressão da DBPII na superfície de células COS-7 transfectáveis, se correlaciona com ensaios de inibição da invasão do parasito e não parece depender da cepa do parasito (Ceravolo et al., 2009; Souza-Silva et al., 2010). Os resultados demonstram que cerca de 40% dos indivíduos estudados desenvolvem anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor (BIABs), sendo esta resposta de longa-duração e estável independente dos níveis de transmissão de malária (6 anos de acompanhamento). De fato, nosso grupo de pesquisa e outros já haviam demonstrado que nem todos os indivíduos expostos ao *P. vivax* desenvolvem

anticorpos inibitórios, mas, uma vez adquiridos, estes anticorpos são de longa duração e independem da cepa do parasito (Revisto por Sousa et al., 2014).

Considerando a presença e a persistência de anticorpos inibitórios de ligação ao longo dos quatro cortes transversais do estudo, os indivíduos puderam ser classificados em três grupos distintos. Curiosamente, os indivíduos considerados respondedores de elite, isto é, que mantiveram a resposta de BIABs durante todo o tempo de acompanhamento do estudo (6 anos, envolvendo períodos de alta e baixa transmissão), apresentaram elevados níveis de anticorpos inibitórios (>80%) sendo esta resposta associada com elevados níveis de anticorpos detectados na sorologia convencional, particularmente contra a DEKnull-2, já que nesses indivíduos a proteína foi capaz de induzir títulos mais altos de anticorpos (dados não mostrados). Estes resultados confirmam achados anteriores do grupo na mesma área, demonstrando a elevada imunogenicidade de DEKnull-2 (Ntumngia et al., 2017).

6.1.1 Relação entre a estabilidade da resposta de anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor e a maior exposição aos mosquitos vetores

Na malária, está bem estabelecido que a imunidade naturalmente adquirida depende de longa-exposição a níveis elevados e constantes de transmissão, sendo comum em áreas hiper e holoendêmicas do sudeste asiático e continente africano (Baird; Snow, 2007). Na Amazônia brasileira, embora existam relatos de imunidade clínica os níveis não se comparam aos de áreas hiperendêmicas (Ladeia-Andrade, 2009; Nicolete et al., 2016).

Na região da Amazônia Legal, os padrões de transmissão da malária dependem tanto do tipo, quanto da proporção da degradação das áreas de floresta nativa e, conseqüentemente, das atividades econômicas predominantes no local (Rufalco-Moutinho et al., 2016). Castro e colaboradores (2006) descreveram que, em áreas de assentamento agrícola, o processo de ocupação do solo para o desenvolvimento de agricultura favorece o contato da população humana com os mosquitos Anopheles, levando a surtos, epidemias e situações endêmicas. Essas alterações geralmente levam a um aumento na densidade das espécies que possuem um maior grau de sinantropia e, portanto, podem estar envolvidas na transmissão da malária. Em ambientes que estão passando por processos intensos

de modificação, os habitats das larvas do vetor são profundamente afetados pela intervenção nos cursos d'água originais. *Anopheles darlingi*, a principal espécie vetora da Amazônia brasileira, é uma das espécies favorecidas pela presença humana e suas conseqüentes mudanças ambientais. Estas, como por exemplo as causadas pela atividade pesqueira, levam ao surgimento de novos habitats larvais capazes de manter as populações do vetor extremamente densas (Barros et al., 2011).

O presente estudo foi realizado no assentamento agrícola de Rio Pardo, onde as famílias podem ser divididas de acordo com seu local de moradia em (i) população de ramal, isto é, moram em vias não pavimentadas organizadas de acordo com o padrão “espinha de peixe” (típico da Amazônia legal), onde uma via principal se conecta perpendicularmente a vias laterais cercadas por floresta tropical (Barros et al., 2011); (ii) população de igarapé ou ribeirinha, que tem seus habitantes vivendo nas margens de pequenos cursos d'água (Browder et al., 2008; Kano et al., 2012). De relevância, a população de igarapé está mais exposta a picada de mosquitos infectados que a população que vive nos ramais. De forma relevante, no presente trabalho, observou-se que a maioria dos indivíduos incluídos nos grupos respondedores (Respondedor de Elite e Respondedor Transiente) residiam na região de Igarapé (90,91% e 60% dos RE e RT, respectivamente). Esse é um dado interessante quando se leva em consideração que esses indivíduos, por residirem próximos a cursos de água, estão de fato mais suscetíveis a picada de vetores anofelinos por ventura infectados. Esse resultado vai de encontro com um trabalho conduzido por Kano e colaboradores (2012), na mesma área de estudo, que demonstrou que o risco de infecção por malária estava diretamente associado ao local de residência. Naquele estudo, os autores demonstram ainda que uma menor frequência de sintomas de malária foi detectada entre residentes que viviam ao longo dos Igarapés (25,8% vs. 34,4% no Igarapé e Ramal, respectivamente), confirmando um certo nível de proteção clínica (Kano et al., 2012).

Sabe-se que, se tratando da malária, o desenvolvimento de uma resposta humoral naturalmente adquirida se dá através de repetidas e frequentes infecções. Levando em conta que os indivíduos residentes no Igarapé estão mais expostos a transmissão vetorial e, dessa forma, a infecções, hipotetizamos que os chamados

Respondedores de Elite (90% vivendo em Igarapé) poderiam estar expostos a um maior número de picadas infectantes. De fato, quando avaliou-se a incidência de malária nos últimos 10 anos nos diferentes tipos de respondedores (RE, TR e PNR), o grupo Responder de Elite apresentou cerca de duas vezes mais episódios de malária que os demais grupos. De acordo com a nossa hipótese – subsidiada pelos dados de sorologia e anticorpos inibitórios – os dados sugerem que para desenvolver uma resposta de anticorpos inibitórios elevada e persistente é necessário exposição a um grande número de picadas de mosquitos infectados. Infelizmente, o pequeno número de indivíduos estudados não permitiu associar estes anticorpos com proteção clínica, isto é, casos agudos sem sintomatologia. Assim, como perspectiva deste trabalho, faz-se necessário aumentar o tamanho da amostra.

6.2 Resposta de células B antígeno-específicas para a DBPII Sal-1 e DEKnull2

Até o presente momento, poucos estudos examinaram a indução e manutenção de células B de memória específicas para malária em seres humanos. Dorfman e colaboradores (2005) foram um dos primeiros a estudar células B de memória na malária e os autores demonstraram que crianças africanas expostas ao *P.falciparum*, eram, na sua maioria, incapazes de gerar células B de memória circulantes específicas para diferentes antígenos do parasito. Os autores concluíram que os resultados poderiam refletir a ausência de tais células ou a falta de sensibilidade nos ensaios utilizados na ocasião para detecção das mesmas (Dorfman et al., 2005). Por outro lado, estudos mais recentes realizados na Tailândia, onde os níveis de transmissão de malária eram baixos e instáveis, demonstraram ser possível detectar MBCs específicas para malária, sugerindo que a imunidade contra ela pode ser mantida mesmo em baixos níveis de transmissão e por um período relativamente longo (Wipasa et al., 2010). Os trabalhos de Wipasa e colaboradores reforçaram nossa hipótese de que MBCs poderiam ser produzidas em situações de baixa transmissão, como acontece na Amazônia legal.

No presente trabalho investigou-se a presença de MBCs específicas para a DBPII Sal-1 e DEKnull-2 nos 42 indivíduos expostos à malária em Rio Pardo. Esta resposta celular pôde ser avaliada após 6 anos de acompanhamento sorológico dos indivíduos expostos, o que permitiu classificá-los de acordo com o perfil de

anticorpos inibitórios (RE, TR, PNR). Para tal, utilizou-se um ensaio de ELISpot otimizado (Jahnmatz et al., 2013), que permitiu detectar frequências relativamente elevadas de células secretoras de anticorpos antígeno-específicas. Mais especificamente, em se tratando da frequência de MBCs antígeno-específicas, as aqui encontradas variaram de 0.1% a 0.2% para DBPII Sal-1 e DEKnull-2, respectivamente. De interesse, esses valores foram cerca de 10 vezes superiores aqueles encontrados por Wipasa e colaboradores (2010), que também avaliou a frequência de MBCs antígeno-específica em áreas de baixa transmissão de malária por *P.vivax*. Estas diferenças na frequências de MBCs podem ser explicadas, em parte, porque no estudo de Wipasa e colaboradores um protocolo de ELISpot menos sensível foi utilizado (Crotty et al., 2003).

A escassez de estudos de resposta de células B de memória na malária, particularmente na causada por *P.vivax*, dificulta a comparação dos resultados aqui encontrados com outros da literatura. Entretanto, pode-se considerar as frequências de MBCs aqui encontradas (0.1 a 0.2%) relativamente elevadas já que podem ser comparadas as frequências obtidas após imunização com vacinas antivirais e bacterianas disponíveis comercialmente, incluindo as contra tétano, sarampo, influenza e coqueluche (Buisman et al., 2009). Estes achados são relevantes já que os indivíduos de Rio Pardo não foram imunizados artificialmente mas expostos naturalmente ao *P.vivax* na Amazônia brasileira.

6.2.1 Avaliação de MBCs específicas para DBPII- Sal1 e DEKnull-2 em indivíduos categorizados de acordo com o perfil da resposta de anticorpos inibitórios

Com o objetivo de superar a tendência natural de DBPII de induzir resposta imune cepa-específica, tem sido desenvolvida uma família de protótipos vacinais, denominadas DEKnull pela remoção do epítipo polimórfico majoritário DEK (Ntumngia et al., 2014; Ntumngia; Adams, 2012). No entanto, trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa em malária demonstraram que a primeira geração da família DEKnull apresentou pouca ou nenhuma imunogenicidade em humanos (Lima, 2017; Melo, 2016). A partir disso, modificações na construção original deram origem a DEKnull-2, e estudos iniciais

do nosso grupo de pesquisa confirmaram que esta proteína era imunogênica em animais experimentais e humanos (Alves, 2016; Ntumngia et. al, 2017;).

No presente estudo, em indivíduos com histórico de longa exposição à malária, investigou-se a capacidade da DEKnull-2 de induzir uma resposta de MBCs específicas. De maneira geral, a DEKnull-2 parece ter sido mais imunogênica que a DBPII Sal1 (cepa de referência). Isto porque dos 16 indivíduos que apresentaram resposta de MBCs para alguma proteína de *P.vivax*, 8 (50%) responderam a DBPII Sal-1 enquanto que quase a totalidade (15/16, 94%) a DEKnull-2. Estes resultados são promissores e confirmam a DEKnull-2 como candidato potencial a vacina do *P.vivax*. De relevância, confirmam a hipótese de que é possível induzir uma resposta de células B de memória específica através de um imunógeno baseado em regiões conservadas da DBPII. Com isto, este estudo abre a possibilidade de que esta é uma abordagem potencial que pode ser utilizada para outros candidatos vacinais contra a malária.

Embora a DEKnull-2 tenha sido mais imunogênica que a DBPII Sal-1, no presente estudo, não foi possível diferenciar os chamados respondedores de elite (RE) dos considerados respondedores transientes (RT). Isto porque tanto a intensidade quanto a frequência de MBCs específicas para DEKnull-2 foram similares entre RE e TR. Este resultado foi inesperado, já que os RE produzem anticorpos de longa duração, que não dependem da cepa do parasito e que parecem envolvidos na proteção clínica (King et al., 2008; Nicollete et al., 2016). Embora os RE e TR apresentaram o perfil similar de MBCs antígeno-específicas, não se pode descartar que as diferentes subpopulações de MBCs podem atuar diferentemente nestes diferentes grupos de respondedores. Nesse contexto, outras subpopulações deverão ser investigadas.

Mais recentemente, avanços no rastreamento de células B de memória revelaram a existência de subpopulações distintas de MBCs que têm consideráveis diferenças funcionais, incluindo células de memória atípicas expressando o fator de transcrição T-box (T-Bet) e células de memória que secretam IgM (Krishnamurty et al., 2016; Kurosaki & Kometani, 2015; Obeng-Adjei et al., 2017). Assim, pretende-se expandir os resultados aqui encontrados entre PR e TR para estudar diferentes subpopulações de células B, bem como outras populações celulares que podem

influenciar no perfil de células B, como as células T foliculares. Dessa forma, espera-se buscar mecanismos imunológicos que permitam entender porque apenas alguns indivíduos desenvolvem uma resposta que é protetora de longa duração. Estudos desta natureza são fundamentais para o desenvolvimento das vacinas baseadas na DBPII.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- i. Nem todos os indivíduos expostos ao *P. vivax* na Amazônia brasileira desenvolvem anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor, mas, uma vez adquiridos, estes anticorpos são de longa duração;
- ii. A DEKnull-2 induz uma resposta de anticorpos de maior intensidade e estabilidade que a DBPII Sal-1 (cepa-referência), reforçando seu potencial como candidato vacinal;
- iii. O desenvolvimento de uma resposta de anticorpos inibitórios de longa-duração, nos indivíduos do grupo Respondedor de Elite, está associado a maior exposição aos mosquitos vetores, avaliada aqui pelo local de moradia e incidência de malária;
- iv. É possível induzir uma resposta de MBCs específicas através de um imunógeno baseado em regiões conservadas da DBPII, como é o caso da DEKnull-2, mesmo em regiões de transmissão instável – perfil encontrado na Amazônia brasileira;
- v. As respostas de células B de memória (MBCs) específicas para a DEKnull-2 ou DBPII Sal-1 não permitem diferenciar o grupo que apresenta resposta de anticorpos inibitórios estável (RE) daquele com resposta transiente (TR).

Referências

- Adams, J. H.; Sim, B. K.; Dolan, S. A.; Fang, X.; Kaslow, D. C.; Miller, L. H. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 15, p. 7085–7089, 1992.
- Agnandji, S. T.; Fernandes, J. F.; Bache, E. B.; Ramharter, M. Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I–III trials. *Future Microbiology*, v. 10, n. 10, p. 1553–1578, 2015.
- Aitken, E. H.; Mbewe, B.; Luntamo, M.; Maleta, K.; Kulmala, T.; Friso, M.-J.; Fowkes, F. J. I.; Beeson, J. G.; Ashorn, P.; Rogerson, S. J. Antibodies to chondroitin sulfate A-binding infected erythrocytes: dynamics and protection during pregnancy in women receiving intermittent preventive treatment. *The Journal of infectious diseases*, v. 201, n. 9, p. 1316–25, 2010.
- Aldrich, C.; Magini, A.; Emiliani, C.; Dottorini, T.; Bistoni, F.; Crisanti, A.; Spaccapelo, R. Roles of the amino terminal region and repeat region of the plasmodium berghei circumsporozoite protein in parasite infectivity. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. 1–12, 2012.
- Amanna, I. J.; Carlson, N. E.; Slifka, M. K. Duration of Humoral Immunity to Common Viral and Vaccine Antigens. *Pediatrics*, v. 122, n. Supplement 4, p. S228.1-S228, 2008.
- Amanna, I. J.; Slifka, M. K. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunological Reviews*, v. 236, n. 1, p. 125–138, 2010.
- Amino, R.; Thiberge, S.; Shorte, S.; Frischknecht, F.; Ménard, R. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. *Comptes Rendus - Biologies*, v. 329, n. 11, p. 858–862, 2006.
- Andrade, B. B.; Reis-Filho, A.; Souza-Neto, S. M.; Clarêncio, J.; Camargo, L. M.; Barral, A.; Barral-Netto, M. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, v. 9, n. 1, p. 13, 2010.
- Baird, J. K.; Snow, R. W. Acquired immunity in a holoendemic setting of Plasmodium falciparum and P. vivax malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 76, n. 6, p. 995–996, 2007.
- Barber, B. E.; Grigg, M. J.; William, T.; Piera, K. A.; Boyle, M. J.; Yeo, T. W.; Anstey,

N. M. Effects of Aging on Parasite Biomass, Inflammation, Endothelial Activation, Microvascular Dysfunction and Disease Severity in *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium falciparum* Malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 215, n. 12, p. 1908–1917, 2017.

Barros, F. S. M.; Arruda, M. E.; Gurgel, H. C.; Honório, N. A. Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon: The importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. *Bulletin of Entomological Research*, v. 101, n. 6, p. 643–658, 2011.

Batchelor, J. D.; Zahm, J. A.; Tolia, N. H. Dimerization of *Plasmodium vivax* DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. *Nature Publishing Group*, v. 18, n. 8, p. 908–914, 2011.

Bayles, I.; Milcarek, C. Plasma Cell Formation, Secretion, and Persistence  The Short and the Long of It. *Crit Rev Immunol*, v. 34, n. 6, p. 481–499, 2014.

Brasil, P.; Zalis, M. G.; De Pina-Costa, A.; Siqueira, A. M.; Júnior, C. B.; Silva, S.; Areas, A. L. L.; Pelajo-Machado, M.; De Alvarenga, D. A. M.; Da Silva Santelli, A. C. F.; Albuquerque, H. G.; Cravo, P.; Santos de Abreu, F. V.; Peterka, C. L.; Zanini, G. M.; Suárez Mutis, M. C.; Pissinatti, A.; Lourenço-de-Oliveira, R.; De Brito, C. F. A.; De Fátima Ferreira-da-Cruz, M.; Culleton, R.; Daniel-Ribeiro, C. T. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*, n. 17, 2017.

Browder, J. O.; Pedlowski, M. A.; Walker, R.; Wynne, R. H.; Summers, P. M.; Abad, A.; Becerra-Cordoba, N.; Mil-Homens, J. Revisiting Theories of Frontier Expansion in the Brazilian Amazon: A Survey of the Colonist Farming Population in Rondônia's Post-Frontier, 1992-2002. *World Development*, v. 36, n. 8, p. 1469–1492, 2008.

Bueno, L. L.; Lobo, F. P.; Morais, C. G.; Mourão, L. C.; De Ávila, R. A. M.; Soares, I. S.; Fontes, C. J.; Lacerda, M. V.; Olórtegui, C. C.; Bartholomeu, D. C.; Fujiwara, R. T.; Braga, É. M. Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). *PLoS ONE*, v. 6, n. 6, 2011.

Buisman, A. M.; De Rond, C. G. H.; Öztürk, K.; Ten Hulscher, H. I.; Van Binnendijk, R. S. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine*, v. 28, n. 1, p. 179–186, 2009.

Cavanagh, D. R.; Elhassan, I. M.; Roper, C.; Robinson, V. J.; Giha, H.; Holder, A. A.; Hviid, L.; Theander, T. G.; Arnot, D. E.; McBride, J. S. A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 1, p. 347–359, 1998.

Cavasini, C. E.; Mattos, L. C. DE; Couto, Á. A. D. A.; Bonini-Domingos, C. R.; Valencia, S. H.; Neiras, W. C. DE S.; Alves, R. T.; Rossit, A. R. B.; Castilho, L.; Machado, R. L. D. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, n. 10, p. 1042–1044, 2007.

Ceravolo, I. P.; Souza-Silva, F. A.; Fontes, C. J. F.; Braga, E. M.; Madureira, A. P.; Krettli, A. U.; Souza, J. M.; Brito, C. F. A.; Adams, J. H.; Carvalho, L. H. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 67, n. 3, p. 270–278, 2008.

Ceravolo, I. P.; Sanchez, B. A. M.; Sousa, T. N.; Guerra, B. M.; Soares, I. S.; Braga, E. M.; McHenry, A. M.; Adams, J. H.; Brito, C. F. A.; Carvalho, L. H. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 156, n. 3, p. 502–510, 2009.

Cerávolo, I. P.; Bruña-Romero, O.; Braga, É. M.; Fontes, C. J. F.; Brito, C. F. A.; Souza, J. M.; Krettli, A. U.; Adams, J. H.; Carvalho, L. H. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 72, n. 6, p. 675–681, 2005.

Chaurio, R. A.; Pacheco, M. A.; Cornejo, O. E.; Durrego, E.; Stanley, C. E.; Castillo, A. I.; Herrera, S.; Escalante, A. A. Evolution of the Transmission-Blocking Vaccine Candidates Pvs28 and Pvs25 in *Plasmodium vivax*: Geographic Differentiation and Evidence of Positive Selection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 6, p. 1–25, 2016.

Chootong, P.; Ntumngia, F. B.; VanBuskirk, K. M.; Xainli, J.; Cole-Tobian, J. L.;

Campbell, C. O.; Fraser, T. S.; King, C. L.; Adams, J. H. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 3, p. 1089–1095, 2010.

Cole-Tobian, J.; King, C. L. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 127, n. 2, p. 121–132, 2003.

Cook, J.; Kleinschmidt, I.; Schwabe, C.; Nseng, G.; Bousema, T.; Corran, P. H.; Riley, E. M.; Drakeley, C. J. Serological markers suggest heterogeneity of effectiveness of malaria control interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. 1–9, 2011.

Crotty, S.; Felgner, P.; Davies, H.; Glidewell, J.; Villarreal, L.; Ahmed, R. Cutting Edge: Long-Term B Cell Memory in Humans after Smallpox Vaccination. *The Journal of Immunology*, v. 171, n. 10, p. 4969–4973, 2003.

De Sousa, T. N.; Kano, F. S.; De Brito, C. F. A.; Carvalho, L. H. The duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: Lessons from the Brazilian Amazon. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 5, p. 608–617, 2014.

Diop, F.; Richard, V.; Diouf, B.; Sokhna, C.; Diagne, N.; Trape, J. F.; Faye, M. M.; Tall, A.; Diop, G.; Balde, A. T. Dramatic declines in seropositivity as determined with crude extracts of *Plasmodium falciparum* schizonts between 2000 and 2010 in Dielmo and Ndiop, Senegal. *Malaria Journal*, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2014.

Dorfman, J. R.; Bejon, P.; Ndungu, F. M.; Langhorne, J.; Kortok, M. M.; Lowe, B. S.; Mwangi, T. W.; Williams, T. N.; Marsh, K. B cell memory to 3 *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in a malaria-endemic area. *The Journal of infectious diseases*, v. 191, n. 10, p. 1623–1630, 2005.

Fowkes, F. J.; McGready, R.; Cross, N. J.; Hommel, M.; Simpson, J. A.; Elliott, S. R.; Richards, J. S.; Lackovic, K.; Viladpai-Nguen, J.; Narum, D.; Tsuboi, T.; Anders, R. F.; Nosten, F.; Beeson, J. G. New insights into acquisition, boosting, and longevity of immunity to malaria in pregnant women. *Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 10, p. 1612–1621, 2012.

FOWKES, F. J. I.; BOEUF, P.; BEESON, J. G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology*, v. 143, n. 02, p. 139–153, 2016.

Fraser, T.; Michon, P.; Barnwell, J. W.; Noe, A. R.; Al-Yaman, F.; Kaslow, D. C.; Adams, J. H. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 7, p. 2772–2777, 1997.

Gupta, S.; Snow, R. W.; Donnelly, C. A.; Marsh, K.; Newbold, C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nature Medicine*, v. 5, n. 3, p. 340–343, 1999.

Hamad, A.; Mandumbi, D. O.; Olotu, A.; Segura, J. L.; Chakravarty, S.; Lee Sim, B. K.; Embon, O. M.; Ayekaba, M. O.; Richie, T. L.; Hergott, D.; Chemba, M.; Nyakarungu, E.; Urbano, V.; Eburu, E.; Hoffman, S. L.; Saverino, E.; Schwabe, C.; Rivas, M. R.; Manoj, A.; Abebe, Y.; Schindler, T.; Maas, C. D.; James, E. R.; Tanner, M.; Eka, M.; Raso, J.; Daubenberger, C.; Li, M.; Abdulla, S.; Ruben, A. J.; Adams, M.; Milang, D. N.; Murshedkar, T.; Billingsley, P. F.; KC, N. Advancing Global Health through Development and Clinical Trials Partnerships: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Assessment of Safety, Tolerability, and Immunogenicity of PfSPZ Vaccine for Malaria in Healthy Equatoguinean Men. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, n. 1, p. 308–318, 2018.

Healer, J.; Chiu, C. Y.; Hansen, D. S. Mechanisms of naturally acquired immunity to *P. falciparum* and approaches to identify merozoite antigen targets. *Parasitology*, p. 1–9, 2017.

Hisaeda, H.; Stowers, A. W.; Tsuboi, T.; Collins, W. E.; Sattabongkot, J. S.; Suwanabun, N.; Torii, M.; Kaslow, D. C. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 12, p. 6618–6623, 2000.

Hoffman, S. L.; Vekemans, J.; Richie, T. L.; Duffy, P. E. The March Toward Malaria Vaccines. *American Journal of Preventive Medicine*, v. 49, n. 6, p. S319–S333, 2015.

Howes, R. E.; Battle, K. E.; Mendis, K. N.; Smith, D. L.; Cibulskis, R. E.; Baird, J. K.; Hay, S. I. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. Suppl 6, p. 15–34, 2016.

Josling, G. A.; Llin??s, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: Knowing when it's time to commit. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 9, p. 573–587, 2015.

Kano, F. S.; Sanchez, B. A. M.; Sousa, T. N.; Tang, M. L.; Saliba, J.; Oliveira, F. M.; Nogueira, P. A.; Gonçalves, A. Q.; Fontes, C. J. F.; Soares, I. S.; Brito, C. F. A.; Rocha, R. S.; Carvalho, L. H. Plasmodium vivax Duffy binding protein: Baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Tropical Medicine and International Health*, v. 17, n. 8, p. 989–1000, 2012.

Kano, F. S.; Souza-Silva, F. A.; Torres, L. M.; Lima, B. A. S.; Sousa, T. N.; Alves, J. R. S.; Rocha, R. S.; Fontes, C. J. F.; Sanchez, B. A. M.; Adams, J. H.; Brito, C. F. A.; Pires, D. E. V.; Ascher, D. B.; Sell, A. M.; Carvalho, L. H. The Presence, Persistence and Functional Properties of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 12, p. 1–21, 2016.

Karunajeewa, H. A.; Mueller, I. How important is gametocyte clearance after malaria therapy? *BMC Medicine*, v. 14, n. 1, p. 93, 2016.

King, C. L.; Michon, P.; Shakri, A. R.; Marcotty, A.; Stanisic, D.; Zimmerman, P. A.; Cole-Tobian, J. L.; Mueller, I.; Chitnis, C. E. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 24, p. 8363–8368, 2008.

Koepfli, C.; Colborn, K. L.; Kiniboro, B.; Lin, E.; Speed, T. P.; Siba, P. M.; Felger, I.; Mueller, I. A High Force of Plasmodium vivax Blood-Stage Infection Drives the Rapid Acquisition of Immunity in Papua New Guinean Children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 9, p. 5–12, 2013.

Krishnamurthy, A. T.; Thouvenel, C. D.; Portugal, S.; Keitany, G. J.; Kim, K. S.; Holder, A.; Crompton, P. D.; Rawlings, D. J.; Pepper, M. Somatically Hypermutated Plasmodium-Specific IgM+Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. *Immunity*, v. 45, n. 2, p. 402–414, 2016.

Kurosaki, T.; Kometani, K.; Ise, W. Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 3, p. 149–159, 2015.

Ladeia-Andrade, S., Ferreira, M.U., Carvalho, M.E., Curado, I., & Coura, J.R. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the

Amazon Basin of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80 3, 452-9, 2009.

Langhorne, J.; Ndungu, F. M.; Sponaas, A.-M.; Marsh, K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*, v. 9, n. 7, p. 725–732, 2008.

Laurens, M. B.; Kouriba, B.; Bergmann-Leitner, E.; Angov, E.; Coulibaly, D.; Diarra, I.; Daou, M.; Niangaly, A.; Blackwelder, W. C.; Wu, Y.; Cohen, J.; Ballou, W. R.; Vekemans, J.; Lanar, D. E.; Dutta, S.; Diggs, C.; Soisson, L.; Heppner, D. G.; Doumbo, O. K.; Plowe, C. V.; Thera, M. A. Strain-specific *Plasmodium falciparum* growth inhibition among Malian children immunized with a blood-stage malaria vaccine. *PLoS ONE*, v. 12, n. 3, p. 1–13, 2017.

Lin, E.; Kiniboro, B.; Gray, L.; Dobbie, S.; Robinson, L.; Laumaea, A.; Schepflin, S.; Stanisic, D.; Betuela, I.; Blood-Zikursh, M.; Siba, P.; Felger, I.; Schofield, L.; Zimmerman, P.; Mueller, I. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. *PLoS ONE*, v. 5, n. 2, 2010.

Longley, R. J.; Sattabongkot, J.; Mueller, I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology*, v. 143, n. 02, p. 154–170, 2016.

López, C.; Yepes-Pérez, Y.; Hincapié-Escobar, N.; Díaz-Arévalo, D.; Patarroyo, M. A. What is known about the immune response induced by *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates? *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. FEB, 2017.

Maestre, A.; Muskus, C.; Duque, V.; Agudelo, O.; Liu, P.; Takagi, A.; Ntumngia, F. B.; Adams, J. H.; Sim, K. L.; Hoffman, S. L.; Corradin, G.; Velez, I. D.; Wang, R. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). *PLoS ONE*, v. 5, n. 7, p. 1–11, 2010.

Malleret, B.; Li, A.; Zhang, R.; Tan, K. S. W.; Suwanarusk, R.; Claser, C.; Cho, J. S.; Geok, E.; Koh, L.; Chu, C. S.; Pukrittayakamee, S.; Ng, M. L.; Ginhoux, F.; Ng, L. G.; Lim, C. T. Regular Article *Plasmodium vivax* restricted tropism and rapid remodeling of. v. 125, n. 8, p. 1314–1325, 2015.

Matuschewski, K. Vaccines against malaria—still a long way to go. *FEBS Journal*, v.

284, n. 16, p. 2560–2568, 2017.

Melo, A. L. Antígenos candidatos à vacina contra as formas sanguíneas de *Plasmodium vivax*: avaliação da memória imunológica de longa duração. [s.l.] Instituto René Rachou, 2016.

Menard, D.; Barnadas, C.; Bouchier, C.; Henry-Halldin, C.; Gray, L. R.; Ratsimbao, A.; Thonier, V.; Carod, J.-F.; Domarle, O.; Colin, Y.; Bertrand, O.; Picot, J.; King, C. L.; Grimberg, B. T.; Mercereau-Puijalon, O.; Zimmerman, P. A. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 13, p. 5967–5971, 2010.

Michon, P.; Cole-Tobian, J. L.; Dabod, E.; Schoepflin, S.; Igu, J.; Susapu, M.; Tarongka, N.; Zimmerman, P. A.; Reeder, J. C.; Beeson, J. G.; Schofield, L.; King, C. L.; Mueller, I. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 76, n. 6, p. 997–1008, 2007.

Michon, P.; Fraser, T.; Adams, J. H. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 6, p. 3164–3171, 2000.

Mota, M. M.; Rodriguez, A. Migration through host cells: The first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cellular Microbiology*, v. 6, n. 12, p. 1113–1118, 2004.

Mueller, I.; Galinski, M. R.; Tsuboi, T.; Arevalo-Herrera, M.; Collins, W. E.; King, C. L. Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*. *Epidemiological Observations and Potential Targets*. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 81

Mueller, I.; Shakri, A. R.; Chitnis, C. E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*, v. 33, n. 52, p. 7489–7495, 2015.

Ndungu, F. M.; Olotu, A.; Mwacharo, J.; Nyonda, M.; Apfeld, J.; Mramba, L. K.; Fegan, G. W.; Bejon, P.; Marsh, K. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 21, p. 8247–52, 2012.

Nicolete, V. C.; Frischmann, S.; Barbosa, S.; King, C. L.; Ferreira, M. U. Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to plasmodium vivax duffy binding protein and clinical immunity to malaria in rural amazonians. *Journal of Infectious Diseases*, v. 214, n. 10, p. 1539–1546, 2016.

Ntumngia, Francis B. Thomson-Luque, Richard. Pires, Camilla Valente. Adams, J. H. The role of the human Duffy antigen receptor for chemokines in malaria susceptibility: current opinions and future treatment prospects. v. 347, n. 6224, p. 882–886, 2015.

Ntumngia, F. B.; Barnes, S. J.; McHenry, A. M.; George, M. T.; Schloegel, J.; Adams, J. H. Immunogenicity of a synthetic vaccine based on Plasmodium vivax Duffy binding protein region II. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 21, n. 9, p. 1215–1223, 2014.

Ntumngia, F. B.; Pires, C. V.; Barnes, S. J.; George, M. T.; Thomson-Luque, R.; Kano, F. S.; Alves, J. R. S.; Urusova, D.; Pereira, D. B.; Tolia, N. H.; King, C. L.; Carvalho, L. H.; Adams, J. H. An engineered vaccine of the Plasmodium vivax Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 13779, 2017.

Ntumngia, F. B.; Adams, J. H. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the Plasmodium vivax Duffy binding protein. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 19, n. 1, p. 30–36, 2012.

Ntumngia, F. B.; King, C. L.; Adams, J. H. Finding the sweet spots of inhibition: Understanding the targets of a functional antibody against Plasmodium vivax Duffy binding protein. *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 12, p. 1055–1062, 2012.

Nussenzweig, R. S.; Vanderberg, J.; Most, H.; Orton, C. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. *Nature*, v. 216, n. 5111, p. 160–162, 1967.

Obeng-Adjei, N.; Portugal, S.; Holla, P.; Li, S.; Sohn, H.; Ambegaonkar, A.; Skinner, J.; Bowyer, G.; Doumbo, O. K.; Traore, B.; Pierce, S. K.; Crompton, P. D. Malaria-induced interferon- γ drives the expansion of Tbethi atypical memory B cells. *PLOS Pathogens*, v. 13, n. 9, p. e1006576, 2017.

Partnership, S. C. T. A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African

Infants. *New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 24, p. 2284–2295, 2012.

Partnership, S. C. T. Vaccines: A step change in malaria prevention? *The Lancet*, v. 385, n. 9978, p. 1591, 2015.

Perraut, R.; Mercereau-Puijalon, O.; Diouf, B.; Tall, A.; Guillotte, M.; Le Scanf, C.; Trape, J. F.; Spiegel, A.; Garraud, O. Seasonal fluctuation of antibody levels to *Plasmodium falciparum* parasitized red blood cell-associated antigens in two Senegalese villages with different transmission conditions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 62, n. 6, p. 746–751, 2000.

Persson, K. E. M.; Lee, C. T.; Marsh, K.; Beeson, J. G. Development and Optimization of High-Throughput Methods To Measure *Plasmodium falciparum* - Specific Growth Inhibitory Antibodies Development and Optimization of High-Throughput Methods To Measure *Plasmodium falciparum*-Specific Growth Inhibitory Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 5, p. 1665–1673, 2006.

Petter, M.; Duffy, M. F. Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations. [s.l: s.n.]. v. 57

Phillips, M. A.; Burrows, J. N.; Manyando, C.; Van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C.; Wells, T. N. C. Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, 2017.

Phimpraphi, W.; Paul, R. E.; Yimsamran, S.; Puangsa-art, S.; Thanyavanich, N.; Maneeboonyang, W.; Prommongkol, S.; Sornklom, S.; Chaimungkun, W.; Chavez, I. F.; Blanc, H.; Looareesuwan, S.; Sakuntabhai, A.; Singhasivanon, P. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a Karen population in Thailand. *Malaria Journal*, v. 7, n. 1, p. 99, 2008.

Recht, J.; Siqueira, A. M.; Monteiro, W. M.; Herrera, S. M.; Herrera, S.; Lacerda, M. V. G. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2017.

Riley, E. M.; Stewart, V. A. Immune mechanisms in malaria  new insights in vaccine development. *Nature Medicine*, v. 19, n. 2, p. 168–178, 2013.

Rocha, M. V.; Franoso, K. S.; Lima, L. C.; Camargo, T. M.; Machado, R. L. D.; Costa, F. T. M.; Renia, L.; Nosten, F.; Russell, B.; Rodrigues, M. M.; Soares, I. S. Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP119. *Vaccine*, v. 35, n. 18, p.

2463–2472, 2017.

Romero, P. J.; Ley, V.; Nussenzweig, R. S.; Nussenzweig, V. SYNTHETIC PEPTIDE VACCINE CONFERS PROTECTION AGAINST MURINE MALARIA Sporozoites are the infective stage of malaria parasites present in the salivary glands of *Anopheles* mosquitoes . An effective vaccine against sporozoites should prevent infection and , t. v. 166, n. November, 1987.

Rufalco-Moutinho, P.; Schweigmann, N.; Bergamaschi, D. P.; Mureb Sallum, M. A. Larval habitats of *Anopheles* species in a rural settlement on the malaria frontier of southwest Amazon, Brazil. *Acta Tropica*, v. 164, p. 243–258, 2016.

Salavatifar, M.; Zakeri, S.; Mehrizi, A. A.; Mirkhazemi, S.; Djadid, N. D. Variant Forms of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Unstable Malaria Transmission of Iran. v. 18, n. September, p. 35–38, 2015.

Seth, R. K.; Bhat, A. A.; Rao, D. N.; Biswas, S. Acquired immune response to defined *Plasmodium vivax* antigens in individuals residing in northern India. *Microbes and Infection*, v. 12, n. 3, p. 199–206, 2010.

Sousa, T. N.; Cerávolo, I. P.; Fernandes Fontes, C. J.; Couto, Á.; Carvalho, L. H.; Brito, C. F. A. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 146, n. 2, p. 251–254, 2006.

Sousa, T. N.; Tarazona-Santos, E. M.; Wilson, D. J.; Madureira, A. P.; Falcão, P. R.; Fontes, C. J.; Gil, L. H.; Ferreira, M. U.; Carvalho, L. H.; Brito, C. F. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malaria Journal*, v. 9, n. 1, p. 334, 2010.

Souza-Silva, F. A.; Da Silva-Nunes, M.; Sanchez, B. A. M.; Ceravolo, I. P.; Malafronte, R. S.; Brito, C. F. A.; Ferreira, M. U.; Carvalho, L. H. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in rural Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 2, p. 185–193, 2010.

Souza-Silva, F. A.; Torres, L. M.; Santos-Alves, J. R.; Tang, M. L.; Sanchez, B. A. M.; Sousa, T. N.; Fontes, C. J. F.; Nogueira, P. A.; Rocha, R. S.; Brito, C. F. A.; Adams, J. H.; Kano, F. S.; Carvalho, L. H. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-Duffy Binding

Protein II (DBPII) immunity. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.

Sturm, A. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.

Tangye, S. G.; Tarlinton, D. M. Memory B cells: Effectors of long-lived immune responses. *European Journal of Immunology*, v. 39, n. 8, p. 2065–2075, 2009.

Tham, W. H.; Beeson, J. G.; Rayner, J. C. *Plasmodium vivax* vaccine research – we've only just begun. *International Journal for Parasitology*, v. 47, n. 2–3, p. 111–118, 2017.

VanBuskirk, K. M.; Cole-Tobian, J. L.; Baisor, M.; Sevova, E. S.; Bockarie, M.; King, C. L.; Adams, J. H. Antigenic Drift in the Ligand Domain of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Confers Resistance to Inhibitory Antibodies. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 190, n. 9, p. 1556–1562, 2004.

Walk, J.; Reuling, I. J.; Behet, M. C.; Meerstein-Kessel, L.; Graumans, W.; Van Gemert, G. J.; Siebelink-Stoter, R.; Van de Vegte-Bolmer, M.; Janssen, T.; Teelen, K.; De Wilt, J. H. W.; De Mast, Q.; Van der Ven, A. J.; Diez Benavente, E.; Campino, S.; Clark, T. G.; Huynen, M. A.; Hermsen, C. C.; Bijker, E. M.; Scholzen, A.; Sauerwein, R. W. Modest heterologous protection after *Plasmodium falciparum* sporozoite immunization: A double-blind randomized controlled clinical trial. *BMC Medicine*, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2017.

Weiss, G. E.; Traore, B.; Kayentao, K.; Ongoiba, A.; Doumbo, S.; Doumtabe, D.; Kone, Y.; Dia, S.; Guindo, A.; Traore, A.; Huang, C. Y.; Miura, K.; Mircetic, M.; Li, S.; Baughman, A.; Narum, D. L.; Miller, L. H.; Doumbo, O. K.; Pierce, S. K.; Crompton, P. D. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 5, p. 1–13, 2010.

WHO. World Malaria Report 2017. Geneva: [s.n.].

Wickramarachchi, T.; Premaratne, P. H.; Perera, K. L. R. L.; Bandara, S.; Kocken, C. H. M.; Thomas, A. W.; Handunnetti, S. M.; Udagama-randeniya, P. V. Natural Human Antibody Responses to *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 under Low Transmission and Unstable Malaria Conditions in Sri Lanka. *Society*, v. 74, n. 1, p. 798–801, 2006.

Wipasa, J.; Suphavitai, C.; Okell, L. C.; Cook, J.; Corran, P. H.; Thaikla, K.; Liewsaree, W.; Riley, E. M.; Hafalla, J. C. R. Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 2, 2010.

World Health Organization. World Malaria Report 2017. [s.l.: s.n.].

Wu, Y.; Sinden, R. E.; Churcher, T. S.; Tsuboi, T.; Yusibov, V. Development of Malaria Transmission-Blocking Vaccines: From Concept to Product. [s.l.] Elsevier Ltd, 2015. v. 89

Yadava, A.; Hall, C. E.; Sullivan, J. A. S.; Nace, D.; Williams, T.; Collins, W. E.; Ockenhouse, C. F.; Barnwell, J. W. Protective Efficacy of a *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein-Based Vaccine in *Aotus nancymae* Is Associated with Antibodies to the Repeat Region. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2014.

Zinkernagel, R. M. On natural and artificial vaccinations. *Annual Review of Immunology*, v. 21, n. 1, p. 515–546, 2003.