

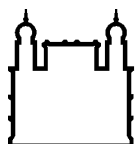
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL
FRENTE AO ANTÍGENO PROTETOR RICO EM CISTEÍNA DE *P. vivax*
(PvCyRPA) EM INDIVÍDUOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

ISABELA FERREIRA SOARES

Rio de Janeiro
Abril de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Isabela Ferreira Soares

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL FRENTE AO ANTÍGENO PROTETOR RICO EM CISTEÍNA DE *P. vivax* (PvCyRPA) EM INDIVÍDUOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientador: Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior

RIO DE JANEIRO

Abril de 2021

Ferreira Soares, Isabela .

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL FRENTE AO ANTÍGENO PROTETOR RICO EM CISTEÍNA DE *P. vivax* (PvCyRPA) EM INDIVÍDUOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA / Isabela Ferreira Soares. - Rio de Janeiro, 2021.

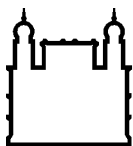
138 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientador: Josué da Costa Lima Junior .

Bibliografia: f. 78-90

1. PvCyRPA. 2. *P. vivax*. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: ISABELA FERREIRA SOARES

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL FRENTE AO ANTÍGENO PROTETOR RICO EM CISTEÍNA DE *P. vivax* (PvCyRPA) EM INDIVÍDUOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Franklin Souza da Silva – Presidente (Fiocruz-RJ)

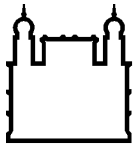
Prof. Dr. Juan Camilo Sanchez Arcila (UC-USA)

Prof. Dr. Kezia Scopel (UFJF)

Prof. Dr. Joanna Reis Oliveira (IFRJ)

Prof. Dr. Flavia Lima Ribeiro Gomes (Fiocruz-RJ)

Rio de Janeiro, 30 de Abril de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Isabela Ferreira Soares**, sob orientação do Dr. Josué da Costa Lima Junior. Ao oitavo dia do mês de junho de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "**Caracterização da resposta imune celular e humoral frente ao Antígeno Protetor Rico em Cisteína de P. vivax (PvCyRPA) em indivíduos da Amazônia brasileira**", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia e Patogênese de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Franklin Souza da Silva - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Juan Camilo Sanchez Arcila - University of California /CALIFORNIA, Dr^a. Kezia Scopel - UFJF/MG e como suplentes: Dr^a. Joanna Reis Santos de Oliveira- IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Flavia Lima Ribeiro Gomes – IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 8 de junho de 2021.

Dr. Franklin Souza da Silva (Presidente da Banca):

Dr. Juan Camilo Sanchez Arcila (Membro da Banca):

Dr^a. Kezia Scopel (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Aos meus amados avós

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha justificativa, aquele que olha com cuidado por todos os passos dados em minha vida, que me dá força, serenidade e luz ao longo da difícil caminhada.

Agradeço aos meus pais Daisy e Juarez que tanto se dedicaram para me educar, que sempre estiveram presentes e dispostos a me acolher e apoiar quando eu pensava que não poderia ir além. Cada uma das conquistas que realizei foi para dar orgulho a vocês, para retribuir minimamente por tudo o que vocês fizeram com tanto amor. Vocês são oficialmente os melhores pais deste mundo.

Agradeço ao meu marido Lucas por aguentar incansáveis crises de choro, por me ver arrancando os cabelos de ansiedade e ainda assim conseguir me fazer esquecer todos os problemas. Obrigada por sempre acreditar que eu consigo, mesmo quando nem eu acredito. Eu sou tão feliz contigo que às vezes mal dá para acreditar na sorte que tenho de ter você ao meu lado.

Ao meu irmão mais novo Vitor eu agradeço por me ensinar a ser corajosa. Você me dá tanto orgulho que sinceramente mal cabe no peito. Obrigada por me ensinar tanto, mesmo quando nós estamos simplesmente nos divertindo sem parar. Eu sempre vou estar aqui por você e sei que você também vai estar.

À minha afilhada Lívia, eu agradeço por ser tão Lívia. Não existe outra forma de descrever. Obrigada por ser quem você é, com esse jeitinho que não liga para nada, mas que no fim liga para tudo e todos. As coisas mais importantes desta vida não cabem em palavras e eu e você somos especialistas nisso. Obrigada por sentir aquilo que eu sinto e por sempre estar aqui.

Aos meus amados avós, aos que aqui ainda estão e aos que já partiram, eu agradeço por tudo. Por cada brincadeira, por cada carinho, por cada bronca, por cada sorriso e abraço apertado. Eu espero ser alguém melhor a cada dia, para que vocês sintam muito orgulho, eu amo vocês para sempre.

Aos meus tios Dil e Fabiana e aos meus padrinhos Janir e Lenora, obrigada por sempre me apoiarem tanto. Agradeço por cada conversa e incentivo, por cada lágrima de alegria derramada diante de uma nova conquista minha e por todo o amor incondicional.

Aos meus afilhados Caetano e Sofia, eu agradeço pela inocência, pelas brincadeiras, todas capazes de apagar as preocupações e os medos. Capazes de me fazer sorrir sem qualquer motivo específico.

As minhas amigas Livia, Karina e Letícia por serem verdadeiros exemplos de mulheres incríveis que eu tenho muita sorte de ter na vida. Obrigada por cada conselho, por sempre segurarem na minha mão, por existirem.

À minha família e amigos, agradeço a todos, seriam necessárias muitas páginas para agradecer a cada um de vocês como eu deveria, mas aqui fica o meu profundo amor e agradecimento por ter vocês.

Aos meus docinhos de laboratório Ada, Aline, Lana, Rafaela, Thaize e Vanessa. Obrigada por cada café da tarde, por cada dia resmungando ou rindo sem parar. Agradeço especialmente à Ada e a Lana, minhas parceiras de todo santo dia, por cada experimento, por cada música dos anos 90, por cada bolo, por cada skincare, enfim por serem essas amigas que eu certamente levarei por toda a vida.

Ao Dr. Josué por acreditar no meu potencial desde a iniciação científica, por me motivar a ir sempre além. Desde a primeira vez que pisei na Fiocruz, fiquei encantada com a importância de tudo o que você fazia e naquele momento você se tornou a minha referência, o lugar onde eu gostaria de um dia chegar. Obrigada por me deixar fazer parte do seu time.

Ao Dr. Rodrigo por toda a dedicação em me co-orientar na correria do seu doutorado, logo no início da minha caminhada acadêmica. Obrigada por cada piada ruim, por cada bronca durante minhas crises de ansiedade, por mostrar que no fim tudo dá certo com muito esforço e que eu posso fazer melhor, só preciso acreditar.

Aos professores e alunos que participaram do seminário Laveran & Deane por cada uma das considerações feitas que ajudaram intensamente no processo de desenvolvimento do meu projeto de mestrado e da construção da minha dissertação. Vou levar a experiência daqueles dias de estudo e debate na ilha por toda a vida.

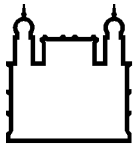
Aos professores do Instituto Oswaldo Cruz por cada uma das aulas ministradas, obrigada por toda a sua dedicação no preparo das aulas, por sua paciência para educar. Aprender com aqueles que são referência é uma experiência indescritível e não posso calcular o valor dos ensinamentos que levarei comigo.

Agradeço a cada um que aceitou participar deste estudo e gentilmente cedeu seu tempo e literalmente seu próprio sangue. A ciência existe para servir a população e por mais que este trabalho seja apenas mais uma gota no oceano, eu realmente acredito que de gota em gota as respostas necessárias são encontradas e que podem levar qualidade de vida e saúde aqueles que mais precisam.

Aos órgãos de fomento Cnpq e Faperj agradeço por todo o apoio financeiro.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

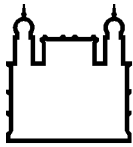
CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL FRENTE AO ANTÍGENO PROTETOR RICO EM CISTEÍNA DE *P. vivax* (PvCyRPA) EM INDIVÍDUOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Isabela Ferreira Soares

As infecções causadas por *Plasmodium vivax* representam um grave problema de saúde pública, sendo esta espécie plasmodial considerada uma das mais difíceis de se eliminar. Por esta razão a pesquisa de antígenos candidatos vacinais específicos para *P. vivax* necessita de impulso, uma vez que atualmente existe uma única candidata vacinal em ensaios clínicos na iniciativa global de desenvolvimento de vacinas anti-maláricas. Neste cenário, a proteína PvCyRPA, presente em merozoítas de *P. vivax* surgiu como uma promissora candidata vacinal. Ensaios em *P. falciparum* demonstraram que anticorpos contra esta proteína são capazes de impedir a invasão de eritrócitos tanto *in vitro* como *in vivo*, além disso, essa proteína foi indicada em uma ampla biblioteca de antígenos de *P. vivax* como uma das proteínas com maior potencial protetor, mesmo com baixos níveis de anticorpos. Nesse aspecto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas imune humoral e celular frente à proteína PvCyRPA em uma população da Amazônia brasileira naturalmente exposta à malária e correlacionar as respostas encontradas com parâmetros de exposição/proteção. Nos resultados obtidos verificou-se que a PvCyRPA é naturalmente imunogênica na população de estudo, e que a presença de anticorpos IgM contra esta proteína parece ser um indicativo de infecções recentes. Os anticorpos citofílicos IgG3 produzidos nessa população estão correlacionados com o número de infecções anteriores. A proteína apresenta uma sobreposição importante de epítomos de células B e T e as sequências correspondentes aos epítomos de células T foram capazes de induzir a produção de INF- γ em ensaios de ELISPOT. Estes dados representam a primeira caracterização da resposta imune frente à PvCyRPA em populações brasileiras e reforçam o potencial deste antígeno como um candidato vacinal para *P. vivax*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO *P. vivax* CYSTEINE-RICH PROTECTIVE ANTIGEN (PvCyRPA) IN INDIVIDUALS FROM THE BRAZILIAN AMAZON

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Isabela Ferreira Soares

Infections caused by *Plasmodium vivax* represent a serious public health problem, and this plasmodial species is considered one of the most difficult to eliminate. For this reason, the search for specific vaccine candidate antigens for *P. vivax* needs to be boosted, since there is currently a single vaccine candidate in clinical trials in the global anti-malarial vaccine development initiative. In this scenario, the protein PvCyRPA, present in *P. vivax* merozoites has emerged as a promising vaccine candidate. Tests on *P. falciparum* have shown that antibodies against this protein are able to prevent erythrocyte invasion both *in vitro* and *in vivo*. In addition, this protein has been indicated in a wide library of *P. vivax* antigens as one of the proteins with the greatest protective potential, even with low levels of antibodies. In this regard, the objective of this work was to characterize the humoral and cellular immune responses against PvCyRPA protein in a population of Brazilian Amazon naturally exposed to malaria and to correlate the responses found with exposure / protection parameters. The results obtained showed that PvCyRPA is naturally immunogenic in the study population, and that the presence of IgM antibodies against this protein seems to be an indicative of recent infections. The cytophilic IgG3 antibodies produced in this population seems to be correlated with the number of previous infections. The protein has an important overlap of B and T cell epitopes and the sequences corresponding to the T cell epitopes were able to induce the production of INF- γ in ELISPOT assays. These data represent the first characterization of the immune response to PvCyRPA in Brazilian populations and reinforce the potential of this antigen as a vaccine candidate for *P. vivax*.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XVIII
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Contexto histórico da malária	20
1.2 A malária no mundo	22
1.3 A malária no Brasil	25
1.4 Biologia do parasito	28
1.4.1 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro humano	28
1.4.2 Particularidades de <i>Plasmodium vivax</i>	31
1.5 A resposta imune contra o <i>Plasmodium vivax</i>	34
1.6 Vacinas antimaláricas	519
1.6.1 Principais antígenos candidatos vacinais	41
1.6.2 Vacinas específicas para <i>Plasmodium vivax</i>	45
1.7 Proteína CyRPA de <i>Plasmodium vivax</i>	46
1.8 Vacinologia reversa como aliada no desenvolvimento de uma vacina utilizando a PvCyRPA	49
2 JUSTIFICATIVA	52
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo Geral	53
3.2 Objetivos Específicos	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 Área e população de estudo	54
4.1.1 Área de estudo	54
4.1.2 População de estudo	54

4.1.3	Critério de inclusão de pacientes	55
4.1.4	Critério de exclusão de pacientes	55
4.2	Obtenção de amostras e de dados epidemiológicos	56
4.2.1	Coleta de sangue	56
4.2.2	Coleta de dados epidemiológicos e demográficos	57
4.2.3	Extração de DNA	57
4.2.4	Diagnóstico parasitológico e molecular da malária	57
4.3	Síntese do gene, clonagem e expressão da PvCyRPA recombinante	57
4.4	Avaliação da reatividade de anticorpos IgM, IgG e subclasses PvCyRPA específicos	58
4.5	Predição e obtenção de epítomos de células B e T	59
4.5.1	Predição <i>in silico</i> e análise dos possíveis epítomos de células B	59
4.5.2	Predição <i>in silico</i> e análise dos possíveis epítomos de células T	59
4.5.3	Síntese química dos peptídeos.....	59
4.6	Confirmação dos epítomos preditos	60
4.6.1	Confirmação de epítomos de células B por ELISA	60
4.6.2	Confirmação de epítomos de células T e avaliação da resposta imune celular.....	60
4.7	Análises de dados	61
5	RESULTADOS	62
5.1	Perfil clínico e epidemiológico da população naturalmente exposta à malária residente nas áreas de estudo	62
5.2	Reatividade de anticorpos IgM e IgG de indivíduos naturalmente expostos à malária frente a PvCyRPA recombinante	63
5.3	Frequência e magnitude das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) específicas para PvCyRPA nos indivíduos respondedores	65
5.4	Relação entre a resposta humoral observada e os fatores de exposição/proteção nos indivíduos participantes do estudo	66
5.5	Predição <i>in silico</i> dos possíveis epítomos de células B e T presentes na proteína PvCyRPA	68

5.6	Resposta imune celular de indivíduos naturalmente expostos à infecção frente aos peptídeos sintéticos representando epítomos de células T	71
6	DISCUSSÃO	74
7	PERSPECTIVAS	77
8	CONCLUSÕES	78
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
10	ANEXOS	92
	Anexo I – Resultados de expressão da proteína PvCyRPA recombinante	92
	Anexo II – Resultados de HPLC dos peptídeos sintéticos (WatsonBio)	94
	Anexo III – Publicações no período do mestrado: artigo I	114
	Anexo IV – Publicações no período do mestrado: artigo II.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo resumida com alguns dos principais acontecimentos relatados no contexto histórico da malária.....	22
Figura 2: Distribuição da malária em 2000 e seu status até 2019.....	25
Figura 3: Série histórica de casos de malária notificados no Brasil de 1959 a 2019	27
Figura 4: Mapa de municípios prioritários para malária no Brasil em 2019 e Janeiro a Junho de 2020	28
Figura 5: Ciclo biológico do <i>Plasmodium spp</i>	29
Figura 6: Resposta Imune contra o <i>Plasmodium sp</i>	38
Figura 7: Panorama global de vacinas anti-maláricas atualmente em ensaios clínicos	41
Figura 8: Mecanismo de invasão de eritrócitos mediado pelo complexo Rh5/Ripr/CyRPA	47
Figura 9: Invasão de eritrócitos por merozoítas de <i>P. knowlesi</i> e <i>P. falciparum</i>	49
Figura 10: Comparação entre as etapas envolvidas na vacinologia convencional e na vacinologia reversa	51
Figura 11: Localização dos municípios nos quais foram realizadas as coletas e entrevistas da população de estudo.....	56
Figura 12: Desenho experimental do estudo	61
Figura 13: Resposta de anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA	63
Figura 14: Resposta de anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA divididos por grupo	66
Figura 15: Perfil de subclasses de IgG anti-PvCyRPA	66
Figura 16: Correlação de índices de reatividade de anticorpos IgM anti-PvCyRPA com fatores de exposição/proteção	67
Figura 17: Correlação dos índices de reatividade de anticorpos citofílicos anti-PvCyRPA com fatores de exposição/proteção	68
Figura 18: Representação da localização dos epítomos B e T indentificados na proteína PvCyRPA.....	71
Figura 19: Resposta imune celular observada frente aos pools contendo os epítomos T preditos	72

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Dados epidemiológicos da população de estudo	62
Tabela 1: Características dos epítomos de células B selecionados e dos algoritmos utilizados capazes de prever cada uma das sequências	69
Tabela 3: Características dos epítomos de células T selecionados na predição para realização de ensaios de ELISPOT	70
Tabela 4: Organização dos peptídeos correspondentes aos epítomos de células T nos pools utilizados nos ensaios de ELISPOT	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AMA-1 – Antígeno 1 de Membrana Apical (*Apical Membrane Antigen 1*)
- BSG – Basigina (*Basigin*)
- CellTOS – Proteína Transversal de Oocinetos e Esporozoítas (*Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites*)
- ChAd63 - Adenovírus de Chimpanzé 63 (*Chimpanzee Adenovirus 63*)
- CQ – Cloroquina (*Chloroquine*)
- CSP – Proteína Circunsporozoíta (*Circumsporozoite Protein*)
- CTLs – Células T Citotóxicas CD8⁺ (*CD8⁺ Cytotoxic T Lymphocytes*)
- CyRPA – Antígeno Protetor Rico em Cisteína (*Cysteine-Rich Protective Antigen*)
- DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Dano (*Damage-Associated Molecular Patterns*)
- DBP – Proteína de Ligação ao Antígeno Duffy (*Duffy Binding Protein*)
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- EMP1 – Proteína 1 de Membrana de Eritrócitos (*Erythrocyte Membrane Protein 1*)
- EPA – Exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa Exoprotein A*)
- GLURP – Proteína Rica em Glutamato (*Glutamate-Rich Protein*)
- G6PD – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (*Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase*)
- HBsAg – Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B (*Hepatitis B Virus Surface Antigen*)
- HLA-I – Antígeno Humano Leucocitário de Classe I (*Human Leukocyte Antigen I*)
- IFN γ – Interferon Gamma
- IgG – Imunoglobulina G (*Immunoglobulin G*)
- IgM – Imunoglobulina M (*Immunoglobulin M*)
- IL-10 – Interleucina 10 (*Interleukin 10*)
- IPA – Índice Parasitário Anual
- LLIN – Mosquiteiros Tratados com Inseticida (*Long-Lasting Insecticidal Nets*)
- MPO – Mieloperoxidase (*Myeloperoxidase*)
- MSP1 – Proteína 1 de Superfície de Merozoítas (*Merozoite Surface Protein 1*)
- MSP3 – Proteína 3 de Superfície de Merozoítas (*Merozoite Surface Protein 3*)
- MVA - Vírus Modificado Vaccinia Ankara (*Modified Vaccinia Virus Ankara*)
- NAI – Imunidade Naturalmente Adquirida (*Naturally Acquired Immunity*)
- NETs – Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps*)

NFκB – Fator Nuclear Kappa B (*Nuclear Factor Kappa B*)
NHP – Primatas Não Humanos (*Non-Human Primates*)
OMS – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*)
PS – Pirimetamina + Sulfadoxina
PQ – Primaquina (*Primaquine*)
P230D1M – Domínio 1 da P230
RAS – Esporozoítas Atenuados por Radiação (*Radiation-Attenuated Sporozoites*)
RBL – Proteína de Ligação a Reticulócitos (*Reticulocyte Binding-Like Protein*)
RH5 – Proteína Homóloga de Reticulócito 5 (*Reticulocyte-Binding Protein Homologue-5*)
Ripr – Proteína de Interação com RH5 (*RH5 Interacting Protein*)
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
TEX 1 – Proteína 1 Exportada de Trofozoíta
TLR – Receptor Tipo Toll (*Toll-Like Receptor*)
TNF α – Fator de Necrose Tumoral
TRAP – Proteína Adesiva Relacionada à Trombospondina (*Thrombospondin-Related Adhesion Protein*)
8AQ – 8-Aminoquinolinas (*8-Aminoquinolines*)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto histórico da malária

A malária é uma doença infecciosa de extrema importância no aspecto de saúde pública mundial uma vez que afeta milhares de indivíduos que habitam em diferentes regiões tropicais e subtropicais presentes em todo globo terrestre (1). A infecção é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que são transmitidos aos hospedeiros humanos durante o repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas (2). A Malária não complicada é caracterizada por sintomas que envolvem acessos febris, que variam de acordo com a espécie plasmodial responsável pela infecção, além de tremores, dor de cabeça, náusea e vômitos. No caso da malária grave pode ocorrer o desenvolvimento de quadros severos como anemia, síndrome do desconforto respiratório e malária cerebral. A malária acompanha a história da humanidade desde a antiguidade, avanços em paleoparasitologia permitiram que cientistas conduzissem estudos moleculares e identificassem DNA de *Plasmodium* em múmias, confirmando assim o caráter ancestral desta doença (3). Dentre estes, foram identificadas a presença de DNA de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) em 2 múmias na tumba dos nobres na grande necrópole de Tebas no Alto Egito datadas aproximadamente de 1000 até 1550 A.C. (4). Estudos moleculares desenvolvidos por Hawass e colaboradores utilizando as múmias do faraó Tutancâmon e de outros membros da realeza egípcia, foram capazes de identificar sequências específicas do gene da proteína AMA-1 de *P. falciparum* em 5 múmias datadas entre 1550 e 1324 A.C, confirmando assim as infecções causadas por este parasito em 2 laboratórios independentes (5) Além disso, existem indicativos em achados literários de civilizações, como em escrituras do período védico (1500 – 800 A.C) na Índia antiga onde foi descrita a ocorrência de “febres outonais” com observação do aumento do baço dos indivíduos acometidos (6). Na literatura grega antiga, o médico Hipócrates observou e descreveu casos de febre recorrentes, característica marcante da malária sugerindo a presença dessa doença neste período histórico (7).

Dentre as principais teorias descritas da origem da malária (causada por *P. falciparum*) destaca-se a de que a doença foi originada em nossos antecessores primatas no continente africano, mais precisamente na região da Etiópia, a partir de

onde a doença se disseminou junto com a humanidade e seus intensos movimentos migratórios se adaptando a diferentes regiões geográficas. Acredita-se que a partir do vale do Nilo, a malária se espalhou por todo o continente africano e pelo mediterrâneo, posteriormente alcançando a Ásia e o Norte do globo a partir da Europa. No início de 1800 a doença já estava amplamente distribuída ao longo de todo o planeta (8).

Devido ao impacto da malária na saúde humana, inúmeros esforços de caráter científico voltados para o melhor entendimento da doença foram realizados a fim de contribuir para o seu controle. Dentre alguns dos achados mais relevantes na malariologia destacam-se as descobertas do pesquisador francês Charles Louis Alphonse Laveran em 1880, no início da era da microscopia (9). A partir de suas observações e anotações foi capaz de descrever os protozoários como os agentes responsáveis por causar a malária, a partir da observação de organismos móveis flagelados no sangue de seus pacientes infectados na cidade de Constantina, na Argélia. A partir de suas descrições e desenhos hoje se sabe que ele já observava naquela época microgametas de *Plasmodium falciparum* (10). Outro grande marco foi a descoberta de que mosquitos eram capazes de transmitir a malária, obtida em 1897 pelo médico britânico Ronald Ross (11). Anos de estudos observacionais e ensaios de alimentação de mosquitos com sangue infectado, culminaram na identificação de corpos pigmentados na parede do estômago de mosquitos que hoje são conhecidos como Anofelinos (12). Juntos, tais achados conseguiram dar um fim definitivo a antiga crença miasmática, onde os indivíduos acreditavam que esta e outras doenças infecciosas seriam contraídas pela emanção de um ar ruim que ao ser inalado era capaz de se propagar. Tendo a palavra malária inclusive sendo derivada desta crença, com origem nas palavras italianas “mal’aria” que podem ser traduzidas como “mau ar” (8). Esses acontecimentos estão representados de maneira resumida na figura 1.

A partir destes e de inúmeros outros avanços de séculos de pesquisa, hoje se sabe que a malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, família Plasmodiidae, subordem Haemosporidiidea, ordem Coccidiida e que existem aproximadamente 250 espécies descritas como capazes de parasitar aves, mamíferos e répteis (13, 14). Dentre estas, as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale (curtisi e wallikeri)* e *P. malariae* se destacam como os principais responsáveis pela malária humana (15, 16). Além destas, espécies de *Plasmodium* simianas como *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* e *P. simium* também são capazes de infectar seres

humanos por meio de transmissão zoonótica. Os mosquitos vetores pertencem ao gênero *Anopheles* em que pelo menos 465 espécies já foram reconhecidas, dentre as quais aproximadamente 70 espécies já foram documentadas como transmissoras da malária humana com diferentes capacidades vetoriais. Dentre as espécies com maior competência de transmitir o *Plasmodium* destacam-se: *An. darlingi* na Amazônia, espécies do complexo *An. gambiae* na África, *An. dirus* e *An. minimus* no sudeste asiático (13, 17).

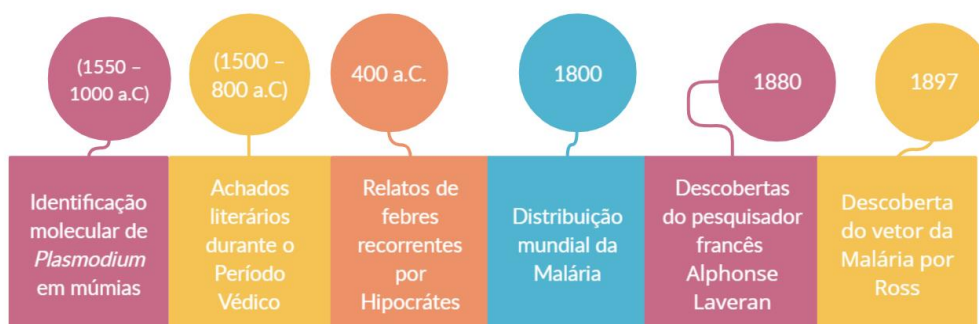


Figura 1: Linha do tempo resumida com alguns dos principais acontecimentos relatados no contexto histórico da malária.

1.2 A malária no mundo

No início dos anos 2000 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 3.2 bilhões de pessoas encontravam-se sob o risco de contrair malária e que no ano anterior haviam ocorrido 350 milhões de casos com 839 mil mortes, a maioria em crianças de até 5 anos de idade na África Subsaariana (18). Dos anos 2000 até 2015, houve uma redução significativa de 75% dos casos em pelo menos 57 países, e uma redução global de 41% dos casos e 61% das mortes por malária. Tais avanços foram consequência de estratégias de vigilância que envolveram o aumento da distribuição de mosquiteiros tratados com inseticidas, a ampliação da realização de diagnósticos, assim como da distribuição de tratamento adequado para as populações residentes das áreas endêmicas envolvidas. No entanto, apesar desteses resultados significativos, em 2015 a doença ainda permanecia endêmica em 91 países (19). Segundo dados do último reporte global de malária, em 2019 estimaram-se um total de 229 milhões de casos e 409 mil mortes nos 87 países que permanecem endêmicos para a doença (**Figura 2**). Analisando a taxa de incidência

de casos de malária (casos a cada 1000 indivíduos expostos sob o risco de se infectar) desde 2000 a 2015 observou-se um declínio de 27% nesta taxa, enquanto de 2015 a 2019 o declínio foi inferior a 2% (20).

São inúmeros os desafios que têm impactado na eficácia do controle da malária, podem-se citar como exemplos desafios operacionais como: a falta de investimentos para aquisição de ferramentas essenciais para prevenção e tratamento, que em sua maioria são quase integralmente provenientes de programas globais com foco em controle de doenças negligenciadas, a dificuldade de distribuição em massa de mosquiteiros tratados com inseticida (LLIN), a falta de estrutura para realização de diagnósticos, aquisição, armazenamento e distribuição de medicamentos básicos e até mesmo desafios comportamentais que envolvem educação e conscientização das populações residentes de áreas endêmicas, entre outros (21). Além disso, existem desafios biológicos que envolvem tanto o parasito como o vetor, dentre eles os relatos crescentes de resistência aos antimaláricos e aos inseticidas (22). A resistência em potenciais vetores da malária já foi amplamente relatada frente aos principais piretróides utilizados como inseticidas em quase toda a África e sudeste asiático e está gradualmente alcançando as Américas. Na região Delta do rio Mekong, na Ásia, houve relatos de resistência de diferentes países não endêmicos, trazendo à tona a preocupação destes vetores migrarem para regiões endêmicas vizinhas (22). No caso dos anti-maláricos, já foi demonstrada a emergência de resistência em *P. falciparum* em regiões de baixa transmissão, como no Sudeste Asiático e na América do Sul antecedendo a expansão desta característica para regiões de elevada transmissão como no caso da África Subsaariana. A resistência à cloroquina e posteriormente à Pirimetamina + Sulfadoxina (PS) (utilizada como alternativa em regiões com ampla distribuição de resistência à cloroquina) são alguns exemplos que seguiram este perfil e contribuíram amplamente para o aumento significativo da morbidade e mortalidade da malária em crianças africanas (23-25). Desde 2001 com a introdução da terapia combinada com derivados de artemisinina, princípio ativo extraído da tradicional erva chinesa *Artemisia annua* (26), a OMS passou a recomendar o uso desta terapia como primeira linha de combate da malária no tratamento de *P. falciparum* resistentes à cloroquina e a PS (27). Mesmo diante do recente estabelecimento desta medicação nova e eficaz, anos após, entre 2008 e 2009 já se identificavam os primeiros relatos de resistência à artemisinina, caracterizada pelo atraso do clearance parasitário após o tratamento monoterápico ou com sua terapia

combinada, no oeste do Camboja e posteriormente sua distribuição por toda a sub-região do grande Mekong, no Sudeste Asiático (25, 28-31). Com a urgência de se desenvolverem novas ferramentas como importantes aliadas, somada a todos estes desafios previamente citados, o ano de 2020 trouxe consigo o que a OMS determinou como a maior ameaça enfrentada até o momento para avançar na eliminação da malária, a pandemia do covid-19, oficialmente declarada em Janeiro de 2020 como uma emergência mundial de saúde pública. A organização desenvolveu inclusive uma análise de modelagem em que prevê aumentos de 20% na morbidade e 50% na mortalidade causadas por malária na África subsaariana durante toda a pandemia de covid-19, como resultado de uma redução de 75% de medidas rotineiras de controle (redução da distribuição LLIN e escassez de medicamentos) (20, 32, 33).

Além de todas estas questões visualizadas em um contexto geral global, ainda é necessário levar em conta as particularidades da malária em cada localidade para garantir assim a eficácia das diferentes medidas aplicadas. Juntos *P. falciparum* e *P. vivax* correspondem às espécies responsáveis pela maioria dos casos de malária no mundo, no entanto, a sua distribuição pelo globo terrestre é bem diferenciada (34). A distribuição de *P. falciparum*, corresponde a aproximadamente 99,7% dos casos no continente Africano, enquanto *P. vivax*, considerada a espécie plasmodial mais dispersa no mundo, é responsável por 76% dos casos nas Américas e também a espécie predominante em regiões temperadas (20). Esse perfil se explica por características como a capacidade de *P. vivax* de sobreviver em regiões climaticamente desfavoráveis e da sua capacidade de permanecer sob uma forma dormente no fígado do hospedeiro denominada hipnozoíta (35). Além disso, *P. vivax* é capaz de desenvolver gametócitos maduros antecipadamente durante o seu ciclo em comparação ao ciclo de *P. falciparum* o que permite a aceleração da transmissão da malária *vivax*. Outra explicação é de que a maior parte da população africana é negativa para o receptor glicoproteico antígeno Duffy, localizado na superfície dos eritrócitos, dificultando a ligação e invasão das células sanguíneas por *P. vivax*, assim como a sua disseminação e manutenção pelo continente Africano (36, 37). Além destas espécies, *P. malariae* é amplamente distribuído no globo terrestre, enquanto *P. ovale* é encontrado na África e na Ásia, porém ambas as espécies apresentam prevalência no Oeste Africano (36).

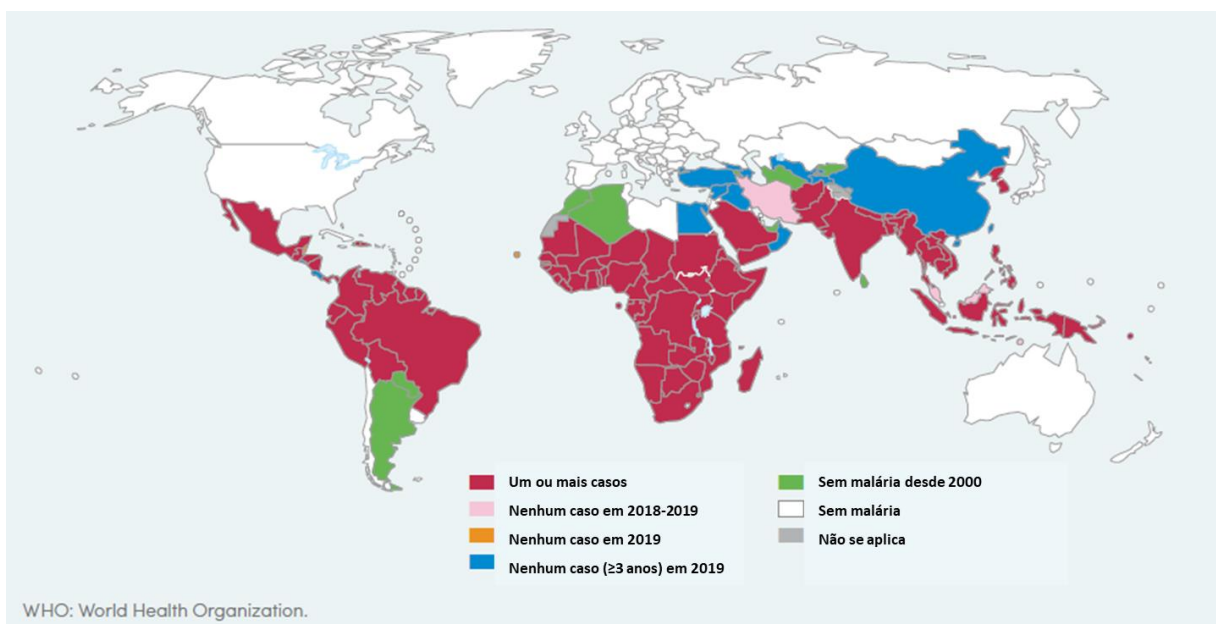


Figura 2: Distribuição da malária em 2000 e seu status até 2019. Adaptado e traduzido de OMS, 2020 (20).

1.3 A malária no Brasil

Em 2019 foram notificados 157.454 casos de malária no Brasil, dentre os quais 89,3% dos casos autóctones foram causados pela espécie *P. vivax*. Tais números representam uma redução de 19,1% em relação ao ano anterior onde 194.572 casos da doença foram registrados (**Figura 3**). A região amazônica concentra 99,9% dos casos relatados no país, destes, a maioria se encontra distribuída por 41 municípios presentes nos estados do Amazonas, Pará, Roraima, Amapá, Acre, Rondônia e Mato Grosso. Tais estados são descritos como prioritários em políticas de controle e intervenção, uma vez que juntos são responsáveis por 80% dos casos autóctones identificados no Brasil (**Figura 4**) (38). Basicamente são descritos 3 sistemas de transmissão no país, presentes nas regiões da floresta amazônica, mata atlântica e na costa brasileira. Na região amazônica onde ocorrem mais de 99% dos casos, *P. vivax* e *P. falciparum* são os principais responsáveis por casos autóctones, sendo *P. vivax* amplamente distribuído nesta região enquanto *P. falciparum* é restrito a determinados pontos, principalmente nos estados do Amazonas e Acre. Na região amazônica estas espécies são transmitidas por

mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus*, especialmente por fêmeas de *Anopheles darlingi*. Nestes sistemas, na transmissão encontrada na mata atlântica, ocorrem casos autóctones causados por *P. vivax* e *P. malariae*, além de casos de malária simiana com transmissões pontuais zoonóticas causadas por *P. brasilianum* e *P. simium*. Na mata atlântica a transmissão é causada tipicamente por mosquitos habitantes naturais de bromélias como *An. cruzii*, *An. bellator* e *An. homunculus* pertencentes ao subgênero *Kerteszia*. No terceiro sistema, a distribuição é geograficamente dispersa e fragmentada ao longo da costa brasileira, o que se dá principalmente por surtos que derivam de casos importados da Amazônia brasileira, consistindo basicamente em transmissão de *P. vivax* por fêmeas de *An. aquasalis* (39, 40).

Apesar dos avanços significativos que sucederam a introdução do programa nacional de prevenção e controle da malária ainda existem inúmeros desafios que tem impacto direto na eliminação da malária no Brasil (41, 42). A geografia e o clima no Brasil, com regiões ricas em floresta tropical e abundantes coleções de água, por si só favorecem o desenvolvimento do mosquito vetor e a manutenção do parasito. Neste cenário, já existe o desafio de proteger populações sob o risco direto de contrair malária, que residem em áreas adjacentes às florestas e fontes de água em condições e infraestrutura precárias (43, 44). Além destes, outros desafios são as infecções assintomáticas, onde a cerca de 50 anos atrás já se descrevia que indivíduos assintomáticos poderiam agir como reservatórios e carregar o *Plasmodium* por até 6 meses favorecendo a transmissão da doença. Estas infecções já foram relatadas no sudeste brasileiro, em populações ribeirinhas da Amazônia brasileira e em comunidades indígenas na bacia amazônica como Colômbia, Peru e Venezuela, adjacentes ao Brasil (45-48). Outro obstáculo é a presença frequente de infecções sub-microscópicas causadas por *P. vivax*, que em áreas próximas de alcançar a eliminação ainda dificultam o diagnóstico apropriado, tornando necessário o uso de técnicas de diagnóstico de custo elevado, ainda inviáveis e indisponíveis como substitutas para a convencional microscopia amplamente empregada no país, especialmente em áreas de difícil acesso e com reduzida infraestrutura, impactando diretamente no controle da malária (49). Outro desafio é a capacidade que a espécie predominante *P. vivax* apresenta de se manter sob a forma de hipnozoítas, promovendo episódios de recaída em seus hospedeiros mesmo meses após a infecção, em casos mais raros até anos após a infecção, consistindo assim em fontes importantes capazes de favorecer a transmissão (50, 51). Relatos de

emergência de *P. vivax* resistentes à cloroquina (CQ) são uma realidade no país, com episódios de recrudescência descritos tanto em pacientes tratados com monoterapia de CQ ou em terapia combinada com primaquina (PQ) (52-54). Tais relatos são de grande preocupação, uma vez que demonstram a existência de parasitos resistentes ao principal medicamento utilizado no país em esquemas preconizados pelo ministério da saúde para o tratamento da malária não complicada causada por *P. vivax* (55).

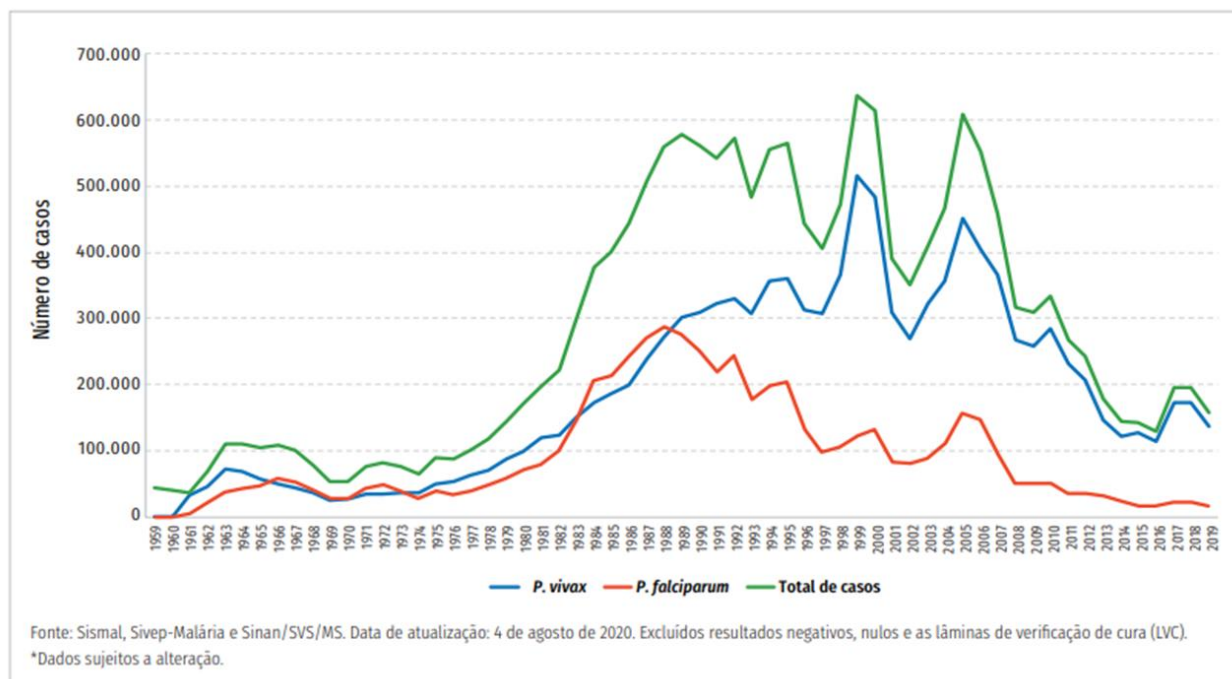


Figura 3: Série histórica de casos de malária notificados no Brasil de 1959 a 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2020 (38).

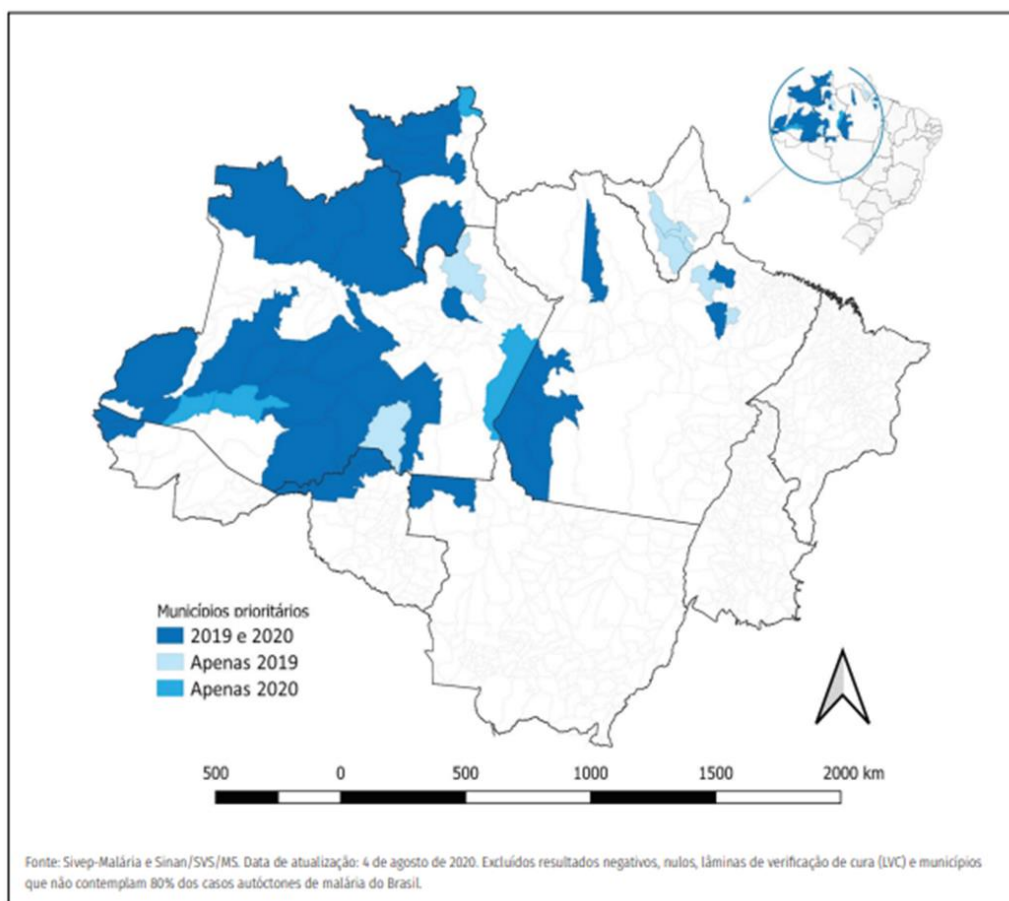


Figura 4: Mapa de municípios prioritários para malária no Brasil em 2019 e Janeiro a Junho de 2020. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2020 (38).

1.4 Biologia do parasito

1.4.1 O ciclo biológico do *Plasmodium* spp. no hospedeiro humano

Os parasitos do gênero *Plasmodium* consistem em patógenos eucarióticos capazes de utilizar uma ampla gama de proteínas que garantem a sua sobrevivência durante seu ciclo biológico, envolvendo 2 estágios assexuais no interior do hospedeiro humano (ciclo exo-eritrocítico e eritrocítico) e 1 estágio sexual no mosquito vetor (56) (**Figura 5**). O ciclo biológico de *Plasmodium* spp. tem início durante o repasto sanguíneo de uma fêmea de mosquito *Anopheles* infectada, capaz de inocular de 10 a 100 esporozoítas por refeição. Após a inoculação, os parasitos permanecem na pele humana por cerca de 30 minutos a partir de onde migram para pequenos vasos sanguíneos ou para o sistema linfático. Aproximadamente 2 horas depois, os esporozoítas alcançam o fígado onde migram por artérias e arteríolas hepáticas até a cavidade sinusoidal onde passam por meio das células endoteliais

ou células de Kupffer, os macrófagos residentes do fígado, de onde prosseguem para obter acesso a hepatócitos subjacentes. Uma vez nos hepatócitos, os esporozoítas ainda migram entre algumas destas células até que se estabeleçam e se diferenciem em milhares de parasitos capazes de invadir as células sanguíneas, denominados merozoítas, encerrando assim o ciclo exo-eritrocítico (57, 58).

Na sua região apical os merozoítas apresentam estruturas como os micronemas e as roptrias que participam da invasão mediante o contato com os eritrócitos. Os micronemas contem adesinas responsáveis pela ligação às células sanguíneas enquanto as roptrias por sua vez, atuam após essa ligação inicial auxiliando na invasão e na formação do vacúolo parasitóforo, região onde os merozoítas se replicarão em células-filhas (59). O processo de invasão que inicia o ciclo eritrocítico pode então ser dividido em 3 fases: uma interação inicial que ocorre com proteínas presentes na superfície do merozoíta, auxiliando na sua reorientação e levando à deformação da membrana do eritrócito. Seguida da interação entre a região apical do parasito onde roptrias e micronemas vão atuar sobre as células sanguíneas promovendo a invasão e por fim a fase final que corresponde ao processo de equinocitose, caracterizado pelo encolhimento do eritrócito logo após a internalização completa do merozoíta e da formação do vacúolo parasitóforo (60). Este vacúolo funcionará como um abrigo para o parasito, permitindo a aquisição de nutrientes, a subcompartimentalização e a exportação de fatores de virulência (61). Após a invasão dos eritrócitos os merozoítas se diferenciam em trofozoítos jovens caracterizados por sua forma de disco bicôncavo, que no interior do vacúolo parasitóforo, começam a se alimentar de pequenas porções de hemoglobina a partir do citóstomo e de outros nutrientes interiorizados que foram transportados pelo plasma. Junto com o crescimento do parasito, moléculas específicas são sintetizadas e exportadas para a superfície das células sanguíneas. Posteriormente os trofozoítos jovens se tornarão trofozoítos maduros, com forma arredondada e metabolicamente mais ativos que os trofozoítos jovens, sendo capazes de expressar diversos antígenos de superfície com propriedade citoaderente. Esta etapa é marcada como a de maior atividade do parasito, com crescimento e nutrição ativos e modificação intensa dos eritrócitos. As moléculas exportadas pelo trofozoíto maduro aumentam consideravelmente a permeabilidade da membrana do eritrócito a nutrientes, permitindo sua nutrição contínua a partir da hemoglobina, eliminada após a digestão como os subprodutos tóxicos da hemoglobina (ferriprotoporfirina-IX, ou grupo heme da hemoglobina) sob a forma de cristais de hemozoína. Posteriormente,

o trofozoíto maduro aumenta de tamanho e dá origem ao esquizonte, caracterizado pelo processo de esquizogonia, com replicação e divisão celular intensas dando origem a novos merozoítas (62-64). Com a ruptura das células sanguíneas, os merozoítas são liberados na circulação e iniciarão novos ciclos de desenvolvimento nos eritrócitos, repetindo os processos de invasão, replicação, egresso e de nova invasão, resultando assim nas manifestações clínicas da doença, principalmente os acessos febris característicos da malária (62).

O próximo estágio do ciclo envolve a transmissão do *Plasmodium* do hospedeiro humano para o mosquito vetor, a partir da diferenciação das formas assexuais provenientes do ciclo eritrocítico em gametócitos femininos e masculinos. Este processo conhecido como gametogênese ocorre apenas em uma pequena proporção de células, dando origem a gametócitos maduros que podem permanecer na circulação do hospedeiro por diversos dias, potencializando as chances de transmissão. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea de mosquito *Anopheles* ingere as células sanguíneas contendo gametócitos, que uma vez no interior do mosquito vetor, experienciam queda de temperatura, modificações no pH e exposição ao ácido xanturênico iniciando o processo de maturação (62, 65). Alguns minutos após alcançar o estômago do vetor, os gametócitos feminino e masculino utilizam proteases para evadir dos eritrócitos e se diferenciam em 8 microgametas e 1 macrogameta, respectivamente, que se fundem e dão origem ao zigoto. O zigoto se transforma em uma forma móvel denominada oocineto e passa por meio da membrana epitelial, formando o oocisto. No oocisto, o parasito inicia um novo ciclo de replicação assexual, dando origem a esporozoítas, que após o rompimento do oocisto são liberados na hemolinfa e posteriormente alcançam e invadem as glândulas salivares do mosquito vetor permitindo a sua transmissão para um novo hospedeiro humano, dando início a um novo ciclo biológico (62, 65-67).

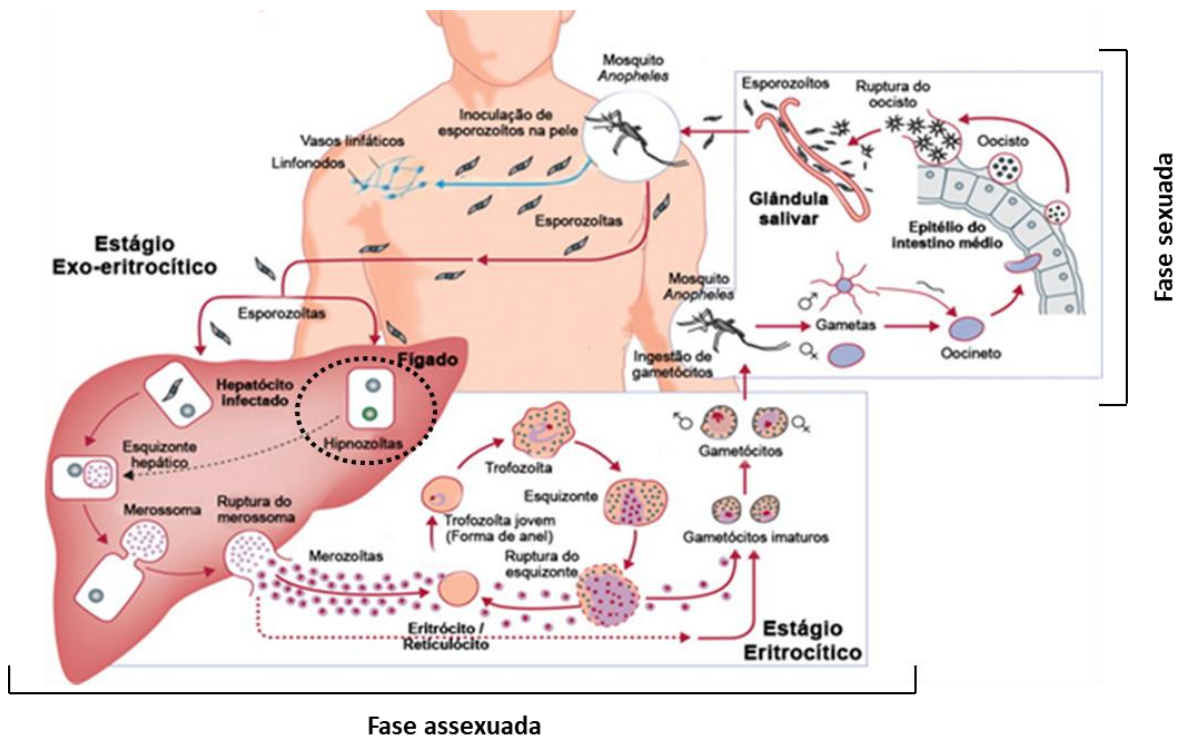


Figura 5: Ciclo biológico do *Plasmodium* spp. O círculo tracejado indica a formação de hipnozoítas, formas latentes exclusivas dos ciclos de *P. vivax* e *P. ovale*. Adaptado e traduzido de Garcia-Basteiro *et al*, 2012 (68).

1.4.2 Particularidades de *Plasmodium vivax*

Enquanto *P. falciparum* invade eritrócitos maduros, *P. vivax* apresenta uma preferência por eritrócitos jovens, os reticulócitos, esse mecanismo ainda não é bem elucidado, uma vez que ainda não existe um sistema de cultivo *in vitro* estabelecido para esta espécie plasmodial. No entanto, o papel que a família das proteínas ligadoras de reticulócitos (RBP) apresentam durante o processo de invasão de reticulócitos já é bem descrito na literatura científica. Esta preferência de *P. vivax* tem impacto direto em fatores como a dinâmica da infecção, em potenciais reservatórios e em mecanismos de morte do parasito (69). Enquanto *P. falciparum* modifica intensamente a superfície dos eritrócitos infectados promovendo citoaderência ao endotélio por meio da ação de proteínas como a proteína 1 de membrana de eritrócitos (PfEMP1) e causa quadros de malária grave como a malária cerebral, *P. vivax* raramente está associado a quadros severos em comparação ao *P. falciparum*. No entanto, infecções causadas por *P. vivax* associadas à presença de fatores de risco como crianças com idade inferior a 5

anos, má nutrição e associação à outras doenças infecciosas podem levar a complicações e até mesmo ao óbito.

Tanto *P. vivax* como *P. ovale*, são capazes de desenvolver formas latentes no fígado conhecidas como hipnozoítas, que podem permanecer dormentes por semanas ou meses e gerar recaídas. Esta forma do parasito permite que os pacientes que já eliminaram a infecção sanguínea apresentem uma posterior infecção subsequente mesmo sem reinfeção (70, 71). No caso da malária causada por *P. vivax* os hipnozoítas se comportam de 2 formas: apresentando latência curta em regiões tropicais, com recaídas geralmente obedecendo intervalos de 3 a 6 semanas após a infecção e latência longa em regiões de clima temperado onde este intervalo ocorre entre 8 a 10 meses após a infecção inicial (51). Apesar do mecanismo de ativação dos hipnozoítas ainda não estar completamente elucidado, é essencial que a ativação ocorra em um momento oportuno, permitindo assim a transmissão ao mosquito vetor, a transmissão a um novo hospedeiro e garantindo a manutenção da espécie. Alguns indicativos apontam que episódios de recaídas de *P. vivax* ocorrem após o desenvolvimento de doenças febris como: a própria malária, em função de relatos de recaídas após infecções causadas por *P. falciparum* e de doenças bacterianas como a febre das trincheiras, o tifo endêmico e a febre de Malta, levando a suposição de que componentes específicos inflamatórios de uma resposta febril aguda podem caracterizar fatores importantes para a ativação dos hipnozoítas de *P. vivax* (72).

Os episódios de recaídas promovidos pelos hipnozoítas podem levar à malária crônica, com sintomas relevantes como anemia severa, desnutrição, predisposição à coinfeções e resposta imunológica debilitada (73-75). Estudos provenientes de diferentes países tropicais como Indonésia, Papua-Nova Guiné, Tailândia e Índia, apontam o desenvolvimento de malária grave em uma proporção significativa de pacientes acometidos com monoinfecção de *P. vivax* (variando de 20% a 40% dos pacientes), com apresentação de quadros severos caracterizados por anemia, trombocitopenia, síndrome respiratória aguda, dano renal, entre outros (76). A capacidade de *P. vivax* de produzir hipnozoítas somada ao seu elevado potencial transmissor, garantido por características como a produção antecipada e contínua de gametócitos com ciclo mais curto no mosquito vetor, quando comparada com outras espécies como *P. falciparum*, caracteriza essa espécie plasmodial como uma das mais difíceis de eliminar (77, 78).

No tratamento das formas exo-eritrocíticas de *P. vivax* as 8-aminoquinolinas (8AQ) têm sido amplamente utilizadas por sua eficácia comprovada em associação com medicamentos capazes de eliminar as formas sanguíneas do parasito a fim de prevenir recaídas. A primaquina representa o principal medicamento desta classe e é tipicamente administrada em conjunto com a cloroquina, obedecendo à posologia de 1 comprimido de primaquina de 15 mg por 14 dias (uma dose total de 210 mg) (79). No Brasil, além deste esquema tradicional, é utilizado o esquema curto, com uso de 2 comprimidos de primaquina de 15 mg durante 7 dias, desenvolvido como uma alternativa para contornar à baixa adesão ao tratamento (55). Em Julho de 2018, um novo medicamento foi aprovado pelo Food and Drug Administration nos Estados Unidos, a tafenoquina, uma 8-aminoquinolina de longa duração, utilizada em dose única e capaz de atuar por cerca de 20 dias no organismo do paciente, constituindo uma alternativa promissora capaz de aumentar a adesão ao tratamento da malária *vivax* (80, 81). No Brasil, o medicamento foi aprovado pela Anvisa em Outubro de 2019, tornando-se assim o primeiro país com malária endêmica no qual a tafenoquina será disponibilizada à população por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) (82). Apesar deste avanço significativo, esta nova medicação assim como a primaquina, apresenta a desvantagem de causar hemólise grave em pacientes com deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), considerada a desordem genética humana mais comumente encontrada, tornando necessária a realização de testes capazes de identificar essa condição a fim de garantir um tratamento eficaz que não ofereça riscos à população (83, 84). Uma vez que a deficiência da G6PD é atrelada a mutações no cromossomo X, algumas das grandes preocupações são: a dificuldade de acesso da população aos testes, além da incapacidade destes testes disponibilizados em identificar a maioria dos casos em que a deficiência da G6PD não é severa e sim intermediária, o que ocorre em mulheres heterozigotas, reduzindo assim a segurança das prescrições e tornando essencial a revisão de políticas e regimes com uso de 8AQ (85).

No caso da gametogênese, enquanto *P. falciparum* é capaz de se diferenciar relativamente tarde durante o estágio sanguíneo, *P. vivax* é capaz de produzir gametócitos maduros significativamente mais cedo, cerca de 8 dias após a inoculação de esporozoítas pelo mosquito vetor, favorecendo intensamente a sua transmissão (86, 87). As densidades dos gametócitos aumentam continuamente acompanhando a evolução da infecção sanguínea, em intervalos de aproximadamente 5 dias, enquanto a infecção evolui para a cronicidade se tornando

assintomática ou levemente sintomática, favorecendo sua transmissão ao mosquito vetor. Essa capacidade de gerar gametócitos antecipadamente e continuamente, somada as recaídas causadas por hipnozoítas são capazes de renovar a infecção sanguínea e favorecer a propagação dos gametócitos, Diferente dos eritrócitos infectados com gametócitos de *P. falciparum*, que no início do processo de maturação são sequestrados no baço e na medula óssea, os reticulócitos infectados com gametócitos de *P. vivax* permanecem altamente flexíveis e capazes de circular livremente pela circulação sem citoaderência significativa, aumentando assim as suas chances de transmissão (87, 88). Outra vantagem intrínseca sugerida na literatura é a de que gametócitos de *P. vivax* conseguem promover a infecção no vetor com níveis reduzidos de gametócitos em comparação ao *P. falciparum*, que somada às características anteriores indicam uma transmissão muito mais eficiente (88, 89). Um estudo utilizando ferramentas computacionais aliadas a dados genômicos, recuperou e reconstruiu os transcriptomas de *P. vivax* e *P. falciparum* a partir do sangue de pacientes infectados, obtido durante os primeiros ciclos da infecção sanguínea, demonstrando que em *P. vivax* a expressão de genes específicos de gametócitos está diretamente correlacionada com a parasitemia e que os transcritos mais abundantes de *P. vivax* incluem genes específicos de gametócitos, demonstrando um comprometimento elevado desta espécie com a transmissão e a importância do desenvolvimento de políticas de controle específicas (90).

1.5 A resposta Imune contra o *Plasmodium vivax*

É evidente a escassez de trabalhos que investiguem a resposta imune contra o *P. vivax* quando comparada com a enorme quantidade de pesquisas direcionadas ao *P. falciparum*, sendo inclusive muitas vezes os estudos realizados nesta espécie plasmodial utilizados como base para inferir características da resposta imunológica desencadeada contra o *P. vivax*. No entanto, a resposta imune naturalmente adquirida (NAI) difere entre estas espécies. No caso de *P. vivax* esta resposta é obtida mais rapidamente e inclusive existem estudos que sugerem que indivíduos provenientes de áreas endêmicas possuem uma maior capacidade de gerar uma resposta imunológica de memória (91-93). A resposta imune desencadeada na malária é bastante complexa, uma vez que se desenvolve contra todos os diferentes estágios do parasito e precisa reconhecer múltiplos antígenos dentro da

extraordinária complexidade biológica do *Plasmodium* (**figura 6**) (94). Esta resposta parece se direcionar primeiramente contra os estágios sanguíneos, conferindo redução da parasitemia e evitando o agravamento da malária clínica nas infecções causadas por *P. vivax*. A presença desta resposta é observada principalmente em indivíduos adultos residentes em áreas holoendêmicas, uma vez que depende de exposição cumulativa frente a múltiplas infecções e relapsos ao longo dos anos. Para a manutenção da NAI a exposição contínua e regular a antígenos é necessária, a fim de gerar a condição de premunição, conferindo um repertório diversificado e de magnitude significativa contra o parasito. Com a diminuição ou interrupção das infecções (em indivíduos que saem de áreas endêmicas e não estão mais expostos à transmissão da malária) a NAI é amplamente reduzida (95).

Durante o desenvolvimento da resposta imune inata, uma das principais características é a intensa resposta pró-inflamatória observada durante a fase aguda da infecção por *P. vivax*, causada principalmente por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), derivados do parasito, e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), componentes endógenos liberados por células do hospedeiro mediante estresse, dano ou morte celular. Acredita-se que este mecanismo é primeiramente mediado por interferon (IFN γ), por ativação do fator nuclear kappa B (NFkB) e por citocinas pró-inflamatórias (96). Em pacientes com malária aguda, já foi demonstrada a presença de células mononucleares periféricas (PBMCs), de monócitos e de células polimorfonucleares (PMNs) contendo assinatura genética capaz de ser estimulada por IFN γ altamente responsivas aos PAMPs (97-99). O aumento de monócitos inflamatórios (CD14⁺CD16⁺) já foi demonstrado no sangue periférico de indivíduos infectados por *P. vivax*, com expressão de maiores níveis de marcadores de ativação quando comparados com os outros subtipos de monócitos circulantes. Além disso, estudos funcionais indicaram que os monócitos inflamatórios são os mais eficientes na fagocitose de reticulócitos infectados por *P. vivax*, a partir da produção de elevados níveis do fator de necrose tumoral (TNF α) assim como espécies reativas de oxigênio (ROS) (98, 100). A estimulação dos monócitos ocorre por agonistas dos receptores Toll-like (TLR) e por imunocomplexos, capazes de induzir níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, e níveis reduzidos de interleucina 10 (IL-10) em comparação aos monócitos de indivíduos não infectados (97, 99). Assim como os monócitos inflamatórios, os neutrófilos apresentam marcadores de ativação aumentados, com produção de ROS e de mieloperoxidase (MPO) na infecção por *P. vivax*. Embora os

neutrófilos não pareçam ter uma ação fundamental para o controle da parasitemia, já foi visto que os seus níveis, assim como seus marcadores de ativação e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) circulantes estão diretamente correlacionadas com a biomassa de parasitos em infecções não complicadas causadas por *P. vivax* (101, 102). Na infecção por *P. falciparum* as células natural killer (NK) têm papel essencial, e se encontram amplamente ativadas, mediando a produção de $INF\gamma$ e o controle do crescimento parasitário levando as células infectadas à morte (103, 104). No caso de *P. vivax* pouco se sabe sobre a atuação das células NK durante a infecção, apesar disso, um estudo em particular demonstrou um perfil de citotoxicidade aumentada das células NK durante a malária *vivax* (105).

A resposta pró-inflamatória e a ativação de células da resposta imune inata são essenciais para a promoção da resposta imune adaptativa. Nesta, a geração de anticorpos é indispensável para o controle da replicação do parasito, sendo considerado que em áreas endêmicas a NAI seja primariamente mediada pela resposta de anticorpos contra os estágios sanguíneos. Além da ativação de linfócitos B, durante os episódios agudos de malária causada por *P. vivax* também ocorre a ativação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, além de mecanismos regulatórios ativados logo no início da infecção que parecem atuar com o intuito de conter a intensa resposta inflamatória, mas que acabam reduzindo a capacidade da resposta imune de controlar a carga parasitária. Portanto, a geração desta resposta na maioria das vezes é capaz de conter, mas não de esterilizar, o que explica a necessidade de exposição contínua aos antígenos do parasito para indução e manutenção de células de memória (96). A produção de imunoglobulinas anti-*Plasmodium* é um processo dependente da atuação de células T. As células T helper foliculares em particular contribuem com a geração de anticorpos de alta afinidade e se encontram aumentadas em indivíduos após infecções causadas por *P. vivax*, sendo os seus níveis no sangue periférico, proporcionais à quantidade de episódios anteriores de malária em pacientes observados. Além disso, estas células correspondem a principal fonte de IL-21, interleucina essencial para o crescimento, diferenciação e mudança de classe de células B (106). As células T citotóxicas $CD8^+$ (CTLs) são amplamente conhecidas por atuar na resposta protetora contra parasitos intracelulares, por meio do reconhecimento de peptídeos apresentados pelo antígeno humano leucocitário de classe I (HLA-I) nas células do hospedeiro. No entanto, seu papel contra os estágios sanguíneos de *Plasmodium spp.* foi inicialmente desconsiderado uma vez que as células sanguíneas geralmente não

expressam HLA-I. Recentemente, um estudo demonstrou que as CTLs são capazes de reconhecer e eliminar reticulócitos infectados por *P. vivax*, uma vez que estas células são capazes de expressar HLA-I, em um mecanismo dependente do peptídeo antimicrobiano granulicina, mediando lise, morte de trofozoítas presentes no interior dos reticulócitos e impedindo novas invasões (107). Na literatura científica, são inúmeros os trabalhos que destacam a importância dos anticorpos na resposta imune contra a malária a partir da investigação de diferentes antígenos. Em populações da bacia amazônica anticorpos IgG contra as proteínas PvCSP, PvMSP1₁₉, PvMSP9 e AMA1 são marcadores de infecções recentes ou de exposição cumulativa à malária. No entanto, evidências de associação dos níveis de anticorpos com proteção são muito limitadas, uma vez que os ensaios sorológicos convencionais são incapazes de distinguir anticorpos protetores e não protetores (96, 108). Um dos importantes mecanismos envolvendo anticorpos, já bem descrito em *P. falciparum* e que até então se assume que também seja essencial na resposta contra o *P. vivax* é o mecanismo de inibição celular dependente de anticorpos (ADCI). Este mecanismo é importante para o controle da parasitemia e dos sintomas da doença e já foi correlacionado com risco reduzido de malária clínica em uma coorte de crianças ganenses (109). Neste processo, anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3, especialmente IgG3) ligados à antígenos do parasito interagem diretamente com os receptores Fc γ RIIA e Fc γ RIIA presentes em monócitos, levando a liberação de uma série de fatores, como o TNF α , capazes de interromper o desenvolvimento dos parasitos presentes no interior das células sanguíneas (110, 111).

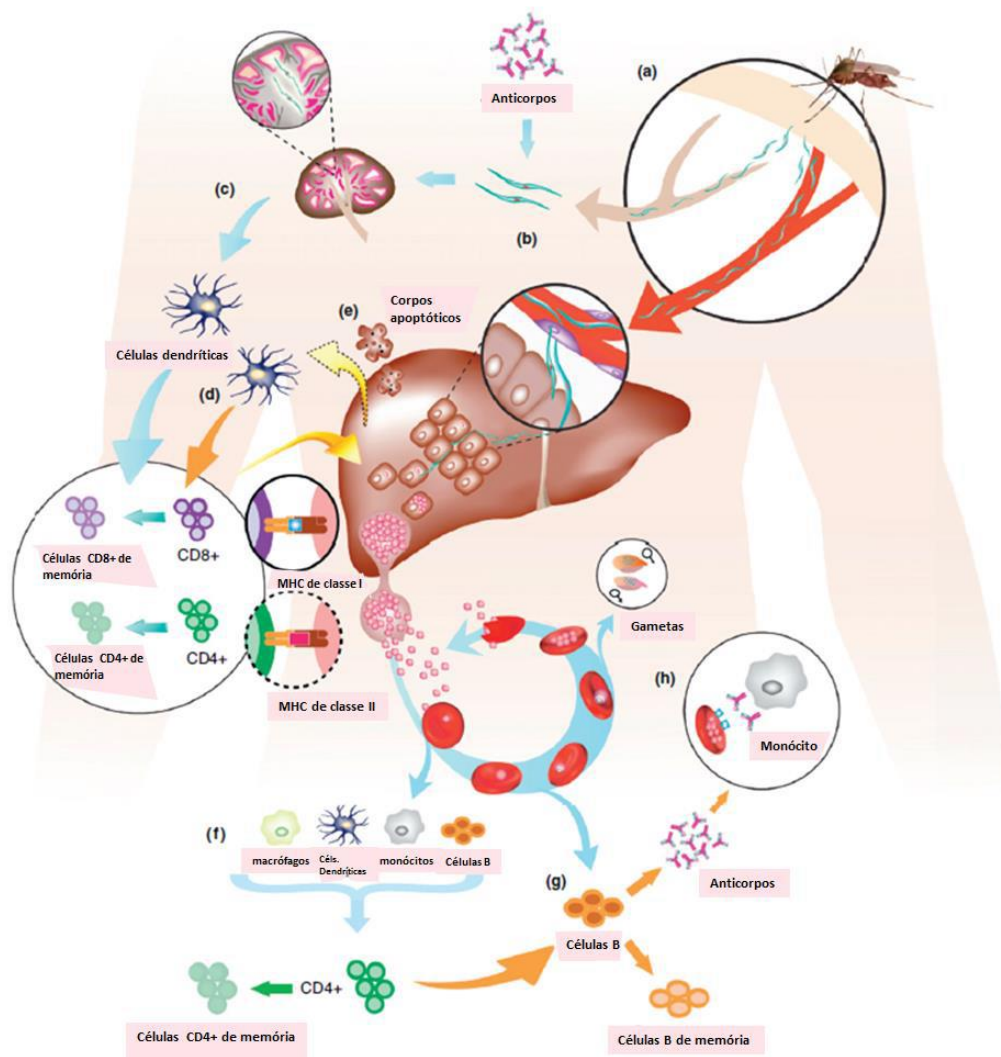


Figura 6: Resposta Imune contra o *Plasmodium* spp. Adaptado e traduzido de Douradinha e Doolan, 2011 (112). (a) Após o repasto sanguíneo da fêmea de *Anopheles* infectada os esporozoítas inoculados invadem pequenos vasos periféricos e migram para o fígado ou são drenados por vasos linfáticos (b) Anticorpos específicos contra os esporozoítas, gerados por exposição prévia ou imunização podem impedir a invasão dos hepatócitos (c) Alguns parasitos são degradados nos vasos linfáticos. Seus antígenos são apresentados por células apresentadoras de antígenos (como as células dendríticas) à células T jovens, induzindo ações efetoras de células T CD8⁺ no fígado (d) Epítomos de células T são apresentados na superfície dos hepatócitos em associação com MHC-I e MHC-II e reconhecidas por células T CD8⁺ e CD4⁺, que ao longo do tempo se diferenciam em células de memória efetora e central (e) A apoptose de hepatócitos infectados é uma possível fonte de antígenos para uma resposta imune subsequente (f) Durante o estágio sanguíneo diferentes células apresentadoras de antígeno podem apresentar antígenos do parasito para células T CD4⁺ a fim de auxiliar nos mecanismos de resposta de anticorpos dependentes de células T (g) Algumas das ações de anticorpos são independentes de

células T e eventualmente as células B se diferenciam em uma população de memória (h) Anticorpos reconhecem antígenos na superfície dos merozoítas, de organelas apicais liberadas no momento da invasão ou nos próprios eritrócitos infectados e promovem opsonização ou ADCl, onde os monócitos impedem o desenvolvimento do parasito nas células sanguíneas infectadas.

1.6 Vacinas anti-maláricas

As pesquisas iniciais em vacinas contra a malária começaram por volta de 1930 e falharam em gerar uma resposta imune protetora a partir da utilização de parasitos mortos ou inativados. Posteriormente com a adição de adjuvantes, modelos de vacinas foram capazes de demonstrar imunogenicidade, como nos trabalhos de Freund e seus colaboradores que demonstraram proteção parcial em patos (113). Ensaio subsequentes foram realizados utilizando roedores como modelo animal e após anos de intensa pesquisa, resultaram no primeiro ensaio em humanos com eficácia comprovada, baseado na inoculação de esporozoítas irradiados em indivíduos participantes do estudo a partir de picadas de Anofelinos infectados (114). Apesar destes avanços, esta estratégia foi considerada impraticável para atender campanhas de vacinação em massa, devido à dificuldade de se cultivar o *Plasmodium* em larga escala para produção de vacinas em números suficientes. A partir disso, com os avanços da biologia molecular, novas portas foram abertas para pesquisas baseadas em regiões específicas presentes em proteínas imunogênicas de *Plasmodium* a partir dos anos 1980 (115). Atualmente, diversas proteínas são amplamente investigadas e os estudos mais avançados identificam o seu potencial vacinal ou de suas subunidades por meio de infecções controladas em humanos (CHMI), uma poderosa ferramenta para o estudo tanto de vacinas como de medicamentos. Esta estratégia se baseia na infecção intencional de indivíduos com *Plasmodium* por meio de mosquitos *Anopheles* infectados, ou por meio de injeções com número pré-definido de parasitos, o que permite simular o curso natural da infecção. Este tipo de ensaio permite a verificação dos níveis de proteção induzidos em ensaios realizados com diferentes candidatos vacinais, além de auxiliar na investigação da eficácia quimioprolifática de novas drogas. No entanto, é importante ressaltar que a sua realização depende de um planejamento adequado e de constante revisão de comitês de ética e de agências regulatórias, além disso, é imprescindível o monitoramento diário dos indivíduos participantes do estudo a fim

de identificar o aparecimento de qualquer sintoma típico da malária ou proliferação exponencial dos estágios assexuais do parasito, prosseguindo imediatamente com o tratamento medicamentoso nestes casos, prevenindo riscos à vida de qualquer um dos participantes (116, 117). Mesmo com todos os avanços obtidos após anos de pesquisa em vacinas contra a malária, ainda não foram descritos correlatos biológicos de proteção e os esforços permanecem contínuos e árduos, requerendo longos períodos de ensaios laboratoriais e clínicos (testes em animais, posteriormente em adultos e só então em crianças) e sempre exigindo amplo suporte financeiro (118). Além destas dificuldades, existem inúmeras outras importantes de se ressaltar, que tiveram e têm impacto direto no desenvolvimento de uma vacina anti-malárica eficaz. Dentre estas podem-se citar algumas como: à imunidade natural incompleta desencadeada no hospedeiro, que requer constante reestimulação pelo parasito, processos imunológicos que por si só causam a morte do *Plasmodium* mas em contrapartida agravam os sintomas no hospedeiro dependendo de sua intensidade, mecanismos de escape utilizados pelo parasito, que permitem a evasão frente ao sistema imunológico do hospedeiro, a dificuldade de se expressar genes para proteínas de *Plasmodium* com alto rendimento e estrutura adequados, além da necessidade de desenvolvimento de novos adjuvantes mais eficientes e potentes (119).

O ciclo biológico do *Plasmodium* spp. é complexo e rico em diversidade antigênica o que explica a existência de diferentes estratégias vacinais voltadas para formas e antígenos específicos do parasito em seus diversos estágios de desenvolvimento. Portanto, atualmente existem 3 estratégias vacinais básicas: as vacinas destinadas a atuar sobre os esporozoítas com o intuito de prevenir o estabelecimento da infecção no fígado do hospedeiro, conhecidas como vacinas pré-eritrocíticas, as vacinas destinadas a atuar sobre as formas assexuais presentes na circulação, reduzindo assim a parasitemia e a sintomatologia da malária, denominadas vacinas eritrocíticas ou de estágio sanguíneo, e por fim, vacinas destinadas a atuar sobre as formas sexuais presentes tanto no hospedeiro humano como no mosquito vetor a fim de interromper a transmissão, conhecidas como vacinas bloqueadoras de transmissão (120). Segundo a iniciativa de desenvolvimento de vacinas criada pela OMS, atualmente existem aproximadamente 22 formulações vacinais contra a malária em ensaios clínicos, dentre as quais 21 se destinam exclusivamente à espécie *P. falciparum*, enquanto apenas uma única formulação vacinal é específica para *P. vivax*. Destas, 10

correspondem a formulações vacinais pré-eritrocíticas, 10 correspondem a formulações vacinais de estágio sanguíneo e apenas 2 correspondem a formulações vacinais bloqueadoras de transmissão (**Figura 7**) (121).

Panorama Global de Vacinas Anti-Maláricas

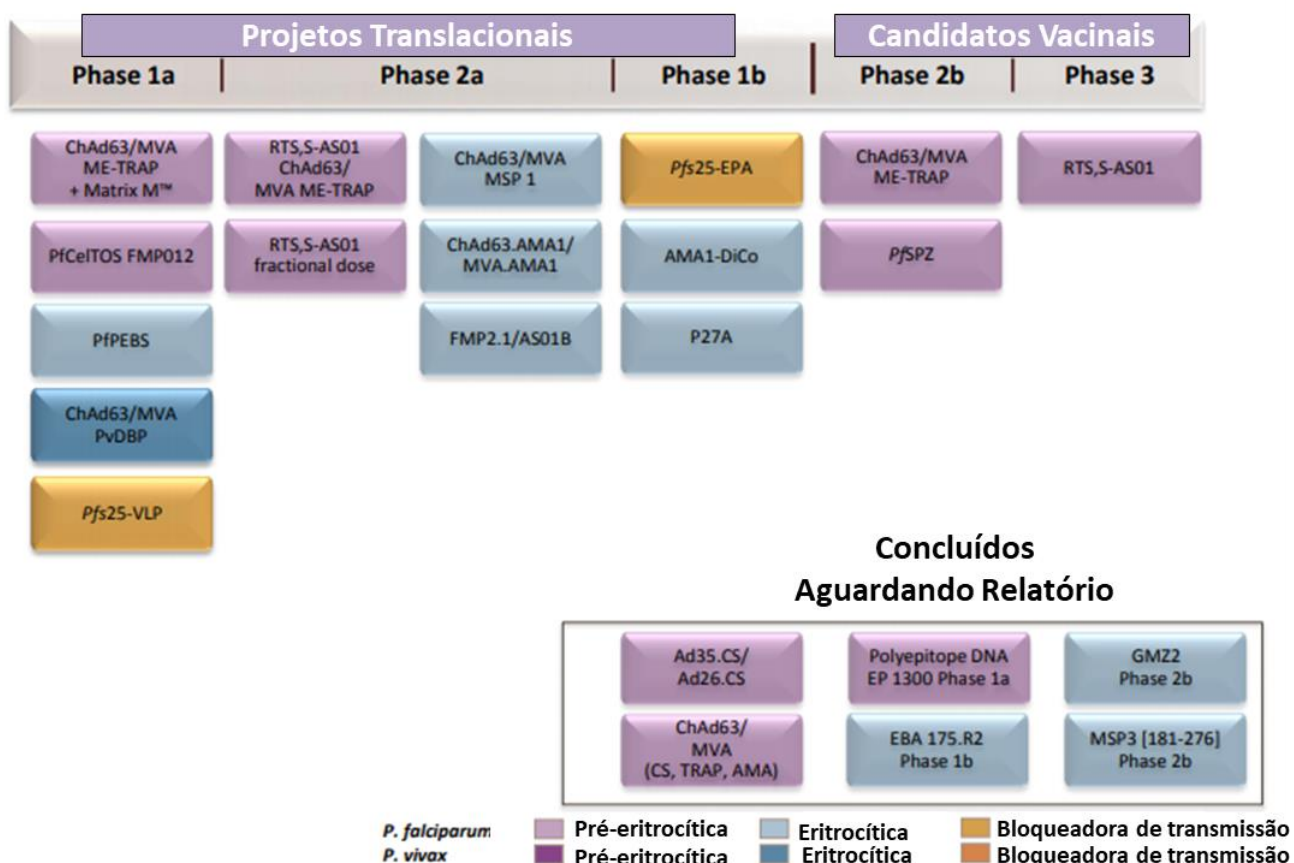


Figura 7: Panorama global de vacinas anti-maláricas atualmente em ensaios clínicos. Adaptado e traduzido de OMS, 2017 (121).

1.6.1 Principais antígenos candidatos vacinais

Dentre os antígenos candidatos vacinais de estágio pré-eritrocítico destacam-se alguns como a proteína circunsporozoíta (CSP), proteína mais abundante presente na superfície dos esporozoítas que atua diretamente na interação entre o parasito e as glândulas salivares do mosquito vetor, assim como o polo basolateral da membrana dos hepatócitos (122, 123). Esta proteína compõe a vacina

atualmente mais desenvolvida para a malária conhecida como RTS,S/AS01 (*Mosquirix*), que é baseada em um longo seguimento da CSP de *P. falciparum* (linhagem NF54) dos aminoácidos 207 ao 395, contendo epítomos B e T previamente identificados, fusionado com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B, o antígeno S (124-126). Esta vacina foi desenvolvida em 1987, em uma parceria entre a indústria farmacêutica GlaxoSmithKline e o Walter Reed Army Institute of Research e participa atualmente de ensaios clínicos de fase 3, nos quais já foi demonstrada eficácia aproximada de 36% em crianças de 5 a 17 meses que receberam 4 doses desta vacina. Tais resultados garantiram que a RTS,S/AS01 além de ser a primeira vacina anti-malárica a passar por ensaios clínicos de fase 3 também foi implementada emergencialmente a partir de 2019 em programas de vacinação de regiões endêmicas africanas como Gana, Quênia e Malawi, sendo uma importante ferramenta de saúde pública nestas regiões de elevada transmissão e mortalidade principalmente em crianças menores de 5 anos causada por *P. falciparum* (127, 128). Outro antígeno amplamente investigado é a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP), proteína necessária para a motilidade dos esporozoítas e em conjunto com a CSP, essencial para a invasão das glândulas salivares do mosquito vetor e dos hepatócitos do hospedeiro vertebrado (129-131). Esta proteína se encontra atualmente sob ensaios clínicos de fase 2 na forma de uma vacina vetorial que utiliza como modelo o adenovírus de chimpanzé 63 (ChAd63) e o vírus modificado Vaccinia Ankara (MVA) carreando múltiplos epítomos de TRAP (132, 133). Existem ainda ensaios clínicos sendo realizados que combinam a vacina Chad63/MVA ME-TRAP com a RTS,S/AS01 com o intuito de induzir uma resposta imune mais abrangente e eficaz (134, 135). A proteína transversal de oocinetos e esporozoítas (CelTOS), que tem papel na travessia de oocinetos no epitélio do estômago de mosquitos e durante a travessia dos hepatócitos no hospedeiro humano, principalmente no momento da saída das células, é caracterizada tanto como um antígeno candidato à uma vacina pré eritrocítica como uma vacina bloqueadora de transmissão (136-138). A CelTOS de *P. falciparum* se encontra atualmente em ensaios clínicos de fase 1, como candidata pré-eritrocítica, compondo uma formulação vacinal baseada nesta proteína recombinante expressa em *E. coli* em associação ao adjuvante FMP012 (121, 139).

Na pesquisa de vacinas de estágio eritrocítico, antígenos como o antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) se destacam. Esta proteína atua por meio de um complexo de receptores, formado por RON2, RON4 e RON5, secretados e injetados

nas membranas celulares promovendo a invasão de hepatócitos e eritrócitos (140, 141). Apesar do seu importante papel na invasão destas diferentes células, esta proteína tem sido amplamente explorada principalmente como uma candidata vacinal de estágio sanguíneo (142, 143), participando de diferentes formulações vacinais que se encontram atualmente em ensaios clínicos, tanto na sua forma recombinante (AMA-1 DiCo), como na forma de vacina vetorial tanto isoladamente (ChAd63-AMA-1/MVA-AMA-1) como em combinação com a CSP e a TRAP (ChAd63/MVA CSP TRAP AMA) (144, 145). Outro antígeno amplamente estudado é a proteína homóloga de ligação a reticulócitos 5 (RH5) de *P. falciparum*, que faz parte da família de proteínas de ligação a reticulócitos (RBL) e integra um complexo de proteínas que atua por meio da interação com o receptor basigina (BSG) presente nos eritrócitos, sendo a sua ação descrita como essencial para a invasão das células sanguíneas. Esta proteína também se encontra em ensaios clínicos utilizando a estratégia vetorial ChAd63/MVA (146-148). A família das proteínas de superfície de merozoítas (MSP) composta por 12 proteínas (MSP1 a MSP12) é caracterizada pelo seu envolvimento no reconhecimento e invasão dos eritrócitos (149, 150), dentre as proteínas desta família amplamente estudadas, MSP1 e MSP3 se destacam por intensa investigação na literatura científica e por participarem de ensaios pré-clínicos e clínicos, respectivamente. Sendo a MSP1 estudada como formulação vacinal na sua forma recombinante e MSP3 sob a forma de vacina peptídica, baseada em epítomos presentes do aminoácido 181 ao 276 (144, 151). A proteína rica em glutamato (GLURP) também é amplamente investigada e existem inúmeras evidências que a apontam como alvo. Esta proteína está localizada no complexo proteico Pfs38 na superfície de merozoítas de *P. falciparum* e se liga aos eritrócitos do hospedeiro humano diretamente por meio do receptor glicoforina A (152, 153). Foi proposto que a região hidrofóbica R0 de GLURP atue como um peptídeo sinal, sendo inclusive esta região parte integrante da vacina em estudo GMZ2, em combinação com a proteína MSP3, atualmente em ensaios clínicos de fase 2 (150, 152). O egresso dos merozoítas do interior dos eritrócitos é uma etapa essencial para garantir a manutenção do ciclo biológico do *Plasmodium*, este mecanismo é protease dependente, caracterizado por uma ação proteolítica intensa de proteínas do parasito que incluem a família de proteínas semelhantes à papaína denominadas SERA e expressas no vacúolo parasitóforo. Dentre elas destaca-se o antígeno candidato vacinal SERA5, a proteína mais abundante da família SERA que apresenta papel importante durante o estágio sanguíneo como um importante

regulador da cinética de egresso dos eritrócitos, garantindo a eficiência da evasão (154-156). O domínio N-terminal desta proteína expresso em *E. coli* se encontra em ensaios clínicos de fase 1 sendo denominado como a candidata SE36 (144). Dentre alguns dos antígenos mais recentes, a proteína 1 exportada de trofozoíta (TEX 1) de *P. falciparum* corresponde a uma nova candidata à uma vacina peptídica de estágio sanguíneo que contém a porção P27A de 104 aminoácidos presente na proteína, formulada no adjuvante GLA-SE atualmente em ensaios clínicos de fase 1 (157-159).

No caso dos antígenos candidatos vacinais que são investigados a fim de compor vacinas bloqueadoras de transmissão, destacam-se proteínas como a P25, proteína expressa na superfície de gametas antes da fertilização e posteriormente em níveis abundantes durante o desenvolvimento de zigotos e oocinetos (160-163). A P25 recombinante de *P. falciparum* se encontra atualmente em ensaios clínicos de fase 1, no caso da formulação Pfs25-EPA, a proteína P25 está presente conjugada com a exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), utilizada a fim de potencializar a imunogenicidade deste antígeno (164). Além dos ensaios clínicos descritos, outros investigam o uso da P25 por meio da estratégia de construção de partículas semelhantes a vírus onde esta proteína está inserida na proteína de revestimento do vírus do mosaico da alfafa (165). Outra proteína amplamente investigada é a P48/45, expressa na superfície dos gametas masculinos e femininos, tendo ação importante no processo de fertilização. Estudos já demonstraram que gametas masculinos que não apresentam P48/45 possuem fertilidade severamente reduzida e são incapazes de aderir e penetrar nos gametas femininos para a produção do zigoto (163, 166, 167). Esta proteína é atualmente investigada em ensaios pré-clínicos que utilizam o seu fragmento C-terminal na composição da formulação vacinal (144, 168). A P48/45 apresenta similaridade superior a 50% entre as espécies de *Plasmodium* e inclusive já foi descrito na literatura científica que o fragmento C-terminal desta proteína é capaz de induzir uma resposta imune cruzada em ensaios experimentais utilizando camundongos, gerando anticorpos capazes de reconhecer tanto a P48/45 de *P. falciparum* como a de *P. vivax* (169, 170). Em conjunto com P48/45, a proteína P230 faz parte de um complexo essencial para a fertilidade dos gametas masculinos de *Plasmodium*, e parasitos mutantes que não apresentam esta proteína também não são capazes de reconhecer e de se associar aos gametas femininos (171-173). Atualmente o domínio 1 da P230 de *P. falciparum* (P230D1M) se encontra em ensaios clínicos sob a forma conjugada a EPA (174).

1.6.2 Vacinas específicas para *Plasmodium vivax*

Os estudos com vacinas específicas para *P. vivax* ainda são muito escassos quando comparados aos estudos voltados para *P. falciparum*. Atualmente existe uma única formulação vacinal em ensaios clínicos para *P. vivax*, a vacina Chad63/MVA PvDBP (121). Esta formulação é composta pelos vetores Chad63/MVA que codificam a sequência PvDPB_RII da linhagem de referência de *P. vivax* Salvador I e foi testada em ensaios clínicos de fase 1 (175, 176). A sequência em questão está presente na proteína de ligação ao antígeno Duffy de *P. vivax* (PvDBP), proteína que interage com o receptor de quimiocinas humano antígeno Duffy presente nos reticulócitos permitindo assim a sua invasão (177). A região II (PvDPB_RII) da PvDPB foi selecionada para compor esta vacina em função de corresponder a uma região conservada, extracelular, rica em cisteína e que abriga o domínio de ligação da proteína, que demonstrou em diversos estudos a capacidade de induzir anticorpos inibitórios em roedores, coelhos e primatas não humanos (NHP) (175, 176, 178).

Além desta, existem 2 formulações vacinais ainda em ensaios pré-clínicos: a vacina VMP002 contendo a CSP recombinante de *P. vivax*, uma variação da formulação anterior VMP001, modificada com o intuito de contornar a baixa eficácia protetora encontrada nos ensaios experimentais previamente realizados (121, 179). A outra formulação vacinal atualmente investigada em ensaios pré-clínicos é baseada na estratégia de esporozoítas atenuados por radiação (RAS) (180-182). Apesar destes avanços, ao se analisar os intensos esforços destinados à investigação de vacinas voltadas para *P. falciparum* ao longo dos anos, é evidente que o desenvolvimento de uma vacina específica para *P. vivax* consiste em uma tarefa árdua e que depende diretamente de elevado suporte financeiro. No entanto, a aceleração das descobertas de novos antígenos e de novas ferramentas nos estudos de *P. falciparum*, em combinação com a longa jornada já percorrida de ensaios vacinais baseados em antígenos isolados de *Plasmodium* com foco em apenas um estágio do ciclo biológico, abrem portas previamente inexploradas e servem como base para direcionar novas pesquisas com propostas de vacinas capazes de combinar diferentes antígenos de *P. vivax* e compor vacinas multiestágio altamente eficazes e específicas para esta espécie plasmodial (183).

1.7 Proteína CyRPA de *Plasmodium vivax*

O antígeno protetor rico em cisteína, conhecido como CyRPA foi primeiramente descrito em *P. falciparum* e consiste em uma proteína de 42.8 kDa contendo 362 resíduos presente nos micronemas de merozoítas (184). Esta proteína é parte integrante de um complexo terciário composto de outras 2 proteínas, a proteína homóloga de ligação a reticulócitos 5, conhecida como RH5 e a proteína de interação com RH5, conhecida como Ripr. A partir do contato do parasito com os eritrócitos e um mecanismo de sinalização que ainda não foi bem elucidado as proteínas são liberadas a partir dos micronemas e formam o complexo terciário na junção entre a região apical do merozoíta e a membrana da célula hospedeira. A partir do complexo, a proteína RH5 interage diretamente com o receptor BSG na superfície das células sanguíneas, levando a um influxo de Ca^{2+} , a subsequente formação de uma junção comunicante, seguida da formação do vacúolo parasitóforo, permitindo assim a invasão do eritrócito pelo parasito (**Figura 8**) (185, 186). Já foi demonstrado na literatura científica em *P. falciparum* que merozoítas mutantes que não apresentam a proteína CyRPA apesar de ainda conseguirem se ligar aos eritrócitos, não conseguem efetuar essa ligação de forma irreversível e portanto não são capazes de invadir as células hospedeiras. Além disso, anticorpos monoclonais anti CyRPA foram capazes de inibir a invasão de células sanguíneas tanto *in vitro* como *in vivo* em ensaios de camundongos modificados contendo eritrócitos humanos (185, 187, 188). Estudos recentes demonstraram que ao ser utilizada como imunógeno aliada ao seu complexo terciário, CyRPA apresentou títulos de anticorpos 7.5 vezes inferiores em comparação a imunização de forma isolada, sugerindo que seus epítomos inibitórios estejam mascarados pelas regiões que estão em contato direto com as proteínas Ripr e RH5 (186).

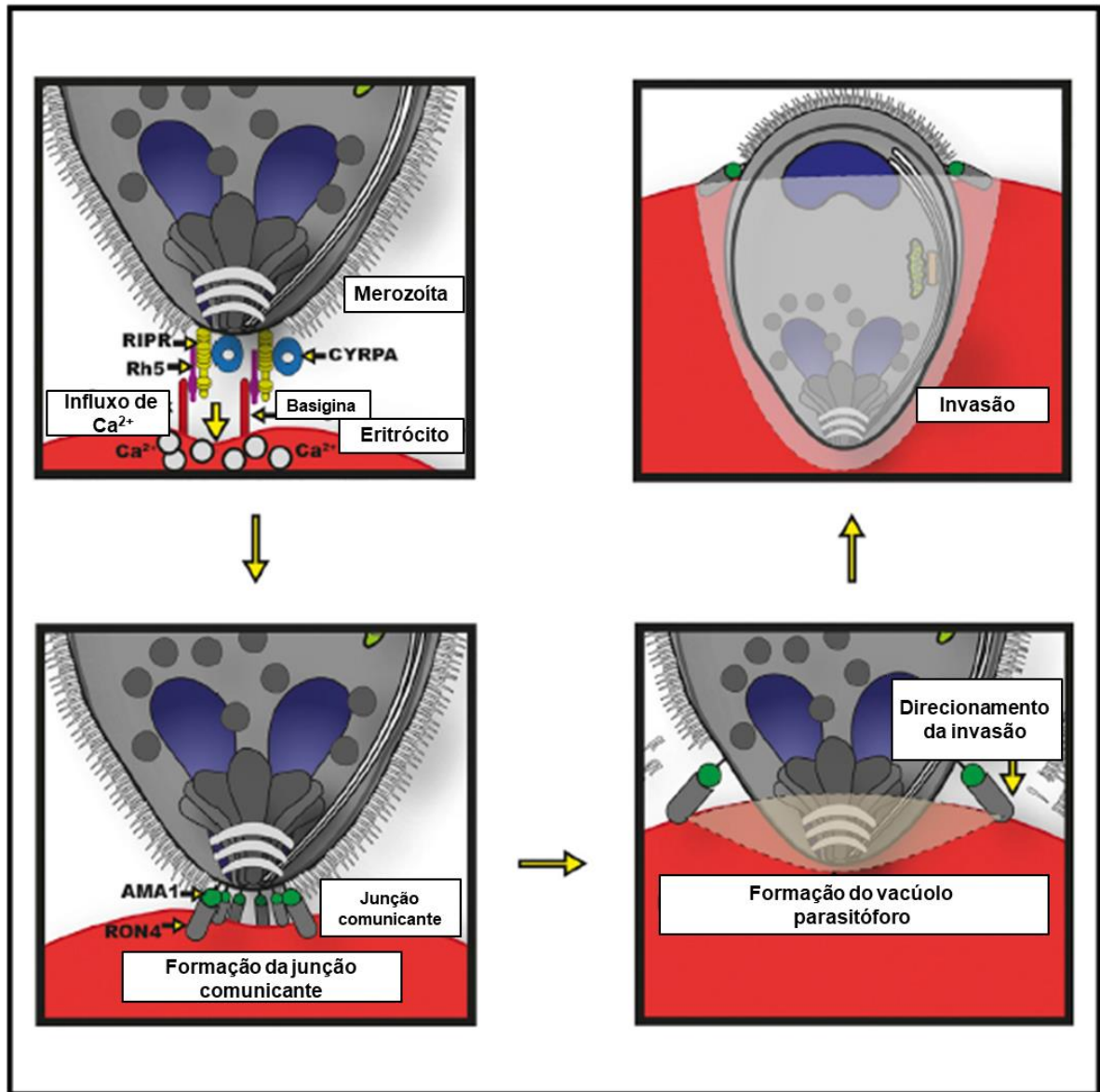


Figura 8: Mecanismo de invasão de eritrócitos mediado pelo complexo Rh5/Rlpr/CyRPA. Adaptado e traduzido de Volz *et al*, 2016 (185).

A PfCyRPA compartilha 42% de homologia com as sua órtologas, identificadas apenas em *P. vivax* e nas espécies que infectam NHP *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* e *P. reichenowi* (184). Porém, divergências no complexo CyRPA, RH5 e Rlpr já foram demonstradas entre diferentes espécies plasmodiais. Enquanto a CyRPA e a Rlpr estão presentes na maioria das espécies de *Plasmodium*, a RH5 está restrita ao pequeno subgênero *Laverania*. Ensaios de CRISPR/Cas9 e de inibição da expressão de CyRPA e Rlpr em *P. knowlesi*, demonstraram que estas proteínas ainda assim são essenciais para a invasão de eritrócitos e que nesta espécie plasmodial não formam um complexo entre si, atuando de forma

independente durante este processo (**Figura 9**). Além disso, pesquisadores também demonstraram em ensaios utilizando anticorpos que diferente de *P. falciparum*, tanto *P. vivax* quanto *P. knowlesi* não necessitam exclusivamente do receptor de eritrócitos BSG para invadir as células sendo capazes de utilizar receptores alternativos para prosseguir com o mecanismo de invasão (189). Baseado nesse estudo é possível inferir que devido a maior proximidade filogenética entre *P. knowlesi* e *P. vivax*, que o papel independente e ainda essencial de CyRPA para a invasão de merozoítas seja semelhante entre estas espécies plasmodiais. Além deste estudo elucidando a necessidade do receptor BSG para a invasão, existe apenas outro estudo em toda a literatura científica abordando a PvCyRPA, que consiste em uma investigação de 38 antígenos de *P. vivax* a partir de ensaios de luminex realizados com plasmas de uma coorte de crianças da Papua Nova Guiné. Após a aplicação de um algoritmo desenvolvido especialmente para identificar o potencial protetor dos anticorpos das amostras coletadas, PvCyRPA foi identificada como um dos antígenos mais promissores, sendo associada com 50% de redução de infecções sintomáticas mesmo em indivíduos que apresentaram baixos níveis de anticorpos, tendo performance superior a clássicos antígenos candidatos vacinais (190).

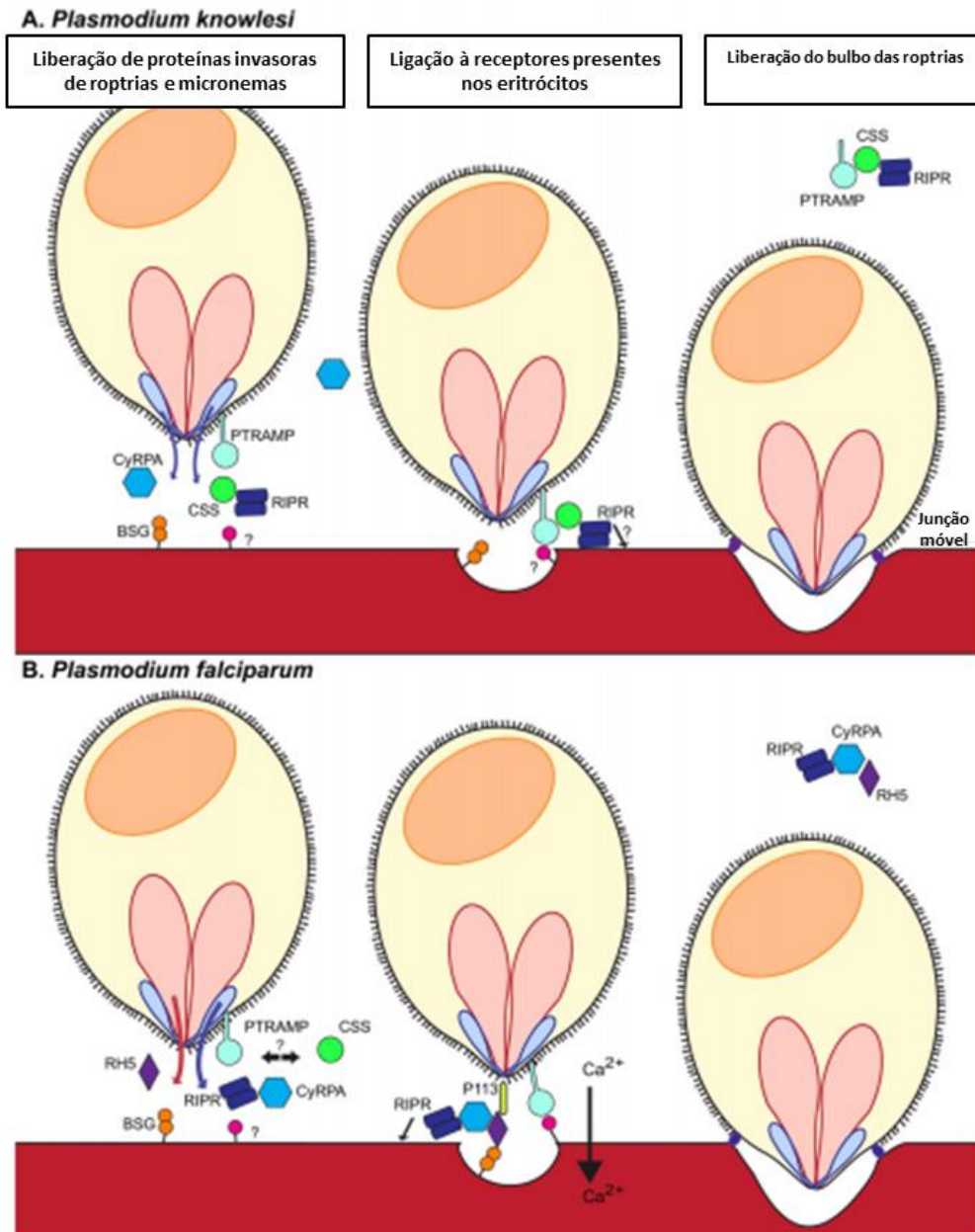


Figura 9: Invasão de eritrócitos por merozoítas de (A) *P. knowlesi* e (B) *P. falciparum*. Adaptado e traduzido de Knuepfer *et al*, 2019 (189).

1.8 Vacinologia Reversa como aliada no desenvolvimento de uma vacina utilizando a PvCyRPA

A vacinologia clássica tradicionalmente se desenvolveu de forma empírica a partir do isolamento, inativação e inoculação de microrganismos inteiros ou de suas porções (191). Apesar de extremamente bem sucedido, este modelo de desenvolvimento de vacinas apresenta certas desvantagens como: o tempo elevado

para a realização das técnicas, a necessidade de cultivar os microrganismos em laboratório e a dificuldade de isolar e purificar antígenos, limitando os estudos aos antígenos mais abundantes presentes nos microrganismos para a realização dos ensaios vacinais. Com o avanço de tecnologias como o sequenciamento de genomas e a bioinformática, a vacinologia reversa surgiu como uma proposta onde alvos vacinais podem ser identificados a partir do uso de algoritmos capazes de prever regiões promissoras para compor uma vacina, baseados na sequência gênica dos microrganismos desejados (192). Portanto, pode-se definir a vacinologia reversa como uma combinação de métodos e ferramentas computacionais que permitem a identificação de candidatos vacinais, por meio da antecipação da seleção precisa de possíveis regiões antigênicas e de epítomos, para a posterior realização de ensaios experimentais e de refinamento a fim de confirmar seu potencial vacinal (**Figura 10**) (193). Esta proposta abre novas portas no que diz respeito a pesquisas de vacinas com microrganismos de difícil cultivo ou não cultiváveis, correspondendo assim a uma proposta bastante promissora no caso de organismos como o *P. vivax*, uma vez que o seu cultivo *in vitro* contínuo ainda não é estabelecido (194).

A vacinologia reversa foi utilizada pela primeira vez na predição de potenciais antígenos para compor uma vacina contra *Neisseria meningitidis*, bactéria responsável por causar a meningite meningocócica nos anos 90. O genoma completo de um isolado de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B foi utilizado e os pesquisadores foram capazes de identificar centenas de genes codificando potenciais antígenos de superfície. A partir destes resultados, foi efetuada a clonagem, amplificação e expressão das sequências preditas permitindo a realização posterior de inúmeros ensaios imunológicos que por fim resultaram em uma vacina multivalente contendo 3 antígenos recombinantes (antígeno de *Neisseria* de ligação à heparina, proteína de ligação com o fator H e adesina A de *Neisseria*) aprovada após ensaios clínicos para uso na Europa em 2013 (195). No caso da malária esta estratégia já foi amplamente abordada em diferentes trabalhos para a identificação de potenciais epítomos de células B e T de *P. falciparum* em proteínas como: AMA-1, CSP, MSP8, MSP10, Pf12, Pfs 48/45, GLURP entre outras (196-201) e para *P. vivax* em proteínas como: MSP9, Pvs25, CelTOS e TRAP (131, 162, 202, 203). Juntos estes trabalhos demonstram como a vacinologia reversa auxilia no desenvolvimento de vacinas aprimorando os ensaios experimentais e acelerando os anos de pesquisa. Nesse contexto, a identificação de epítomos em proteínas de estágio sanguíneo como a PvCyRPA representa um passo promissor

para o desenvolvimento de vacinas contra o *P. vivax*, uma vez que antígenos presentes nesta proteína podem no futuro vir a compor uma vacina eritrocítica isoladamente a fim de fornecer proteção clínica e reduzir tanto a carga parasitária no sangue dos indivíduos infectados como a transmissão da doença ou em combinação com outros antígenos provenientes de diferentes estágios do ciclo biológico a fim de compor uma vacina multiestágio que permita a indução de uma resposta imune muito mais abrangente (56).

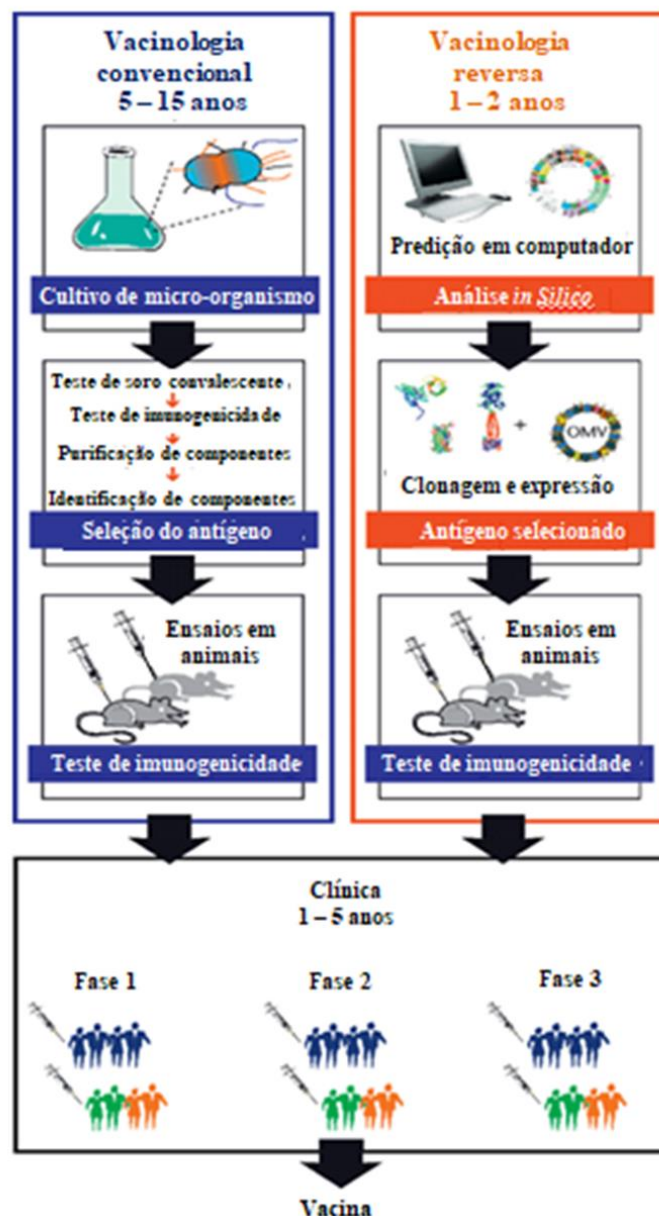


Figura 10: Comparação entre as etapas envolvidas na vacinologia convencional e na vacinologia reversa. Adaptado e traduzido de Soria-Guerra, 2015.

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de vacinas candidatas contra o *P. vivax* tem sido difícil principalmente por questões como a falta de um sistema *in vitro* para o cultivo contínuo deste parasito e pelo equívoco generalizado de que a malária causada pelo *P. vivax* é branda reduzindo assim o impacto global da malária *vivax*. Contudo, as elevadas dispersão e prevalência do *P. vivax* no mundo, a formação de hipnozoítas que causam episódios de recaídas, a geração antecipada de gametócitos em seu ciclo biológico, o significativo número de relatos de malária grave causada por esta espécie plasmodial, somados ao surgimento e dispersão de cepas resistentes ao tratamento na Ásia, no Brasil e na África, são algumas das muitas características que reforçam a importância epidemiológica do *P. vivax* e a urgência do desenvolvimento de vacinas específicas para esta espécie, um passo fundamental para o controle da malária no Brasil e no mundo.

Apesar da existência de pesquisas com *P. vivax* em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, a busca de vacinas contra esta espécie plasmodial ainda é pouco explorada e o número de proteínas antigênicamente relevantes ainda é muito restrito. Em meio a este cenário, a vacinologia reversa surge como uma alternativa promissora para identificação de alvos vacinais contra o *P. vivax*. Atualmente, o mapeamento por predição *in silico* e a posterior confirmação imuno-molecular dos epítomos de células B e T de proteínas candidatas vacinais vem sendo utilizada em diversos patógenos como o HIV e o Influenza (204), fornecendo constantemente subsídios para o desenvolvimento de vacinas e novos testes de diagnóstico eficazes. Na malária, apesar da existência de um número considerável de proteínas candidatas vacinais, como as citadas anteriormente, estudos que utilizem ferramentas de bioinformática aliados a confirmação experimental com antígenos de *Plasmodium* ainda são escassos.

Neste contexto, a identificação de epítomos de células B e T em promissoras candidatas vacinais, como no caso da PvCyRPA, bem como sua utilização em ensaios de antigenicidade, pode representar uma importante contribuição no campo das pesquisas em vacinas contra o *P. vivax*, uma vez que fornecerá informações relevantes sobre a validação e a identificação de novos candidatos vacinais aplicáveis em populações de áreas endêmicas brasileiras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Descrever as respostas imunes celular e humoral desencadeadas frente à PvCyRPA em indivíduos naturalmente expostos à infecção e avaliar a eventual relação dessas respostas específicas com indicativos de exposição e proteção.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a reatividade de anticorpos IgM e IgG de indivíduos naturalmente expostos à malária frente a proteína recombinante representando a PvCyRPA;
- Determinar a frequência e magnitude das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) específicas para PvCyRPA nos indivíduos respondedores;
- Avaliar a relação entre a resposta humoral observada e os fatores de exposição/proteção nos indivíduos participantes do estudo;
- Realizar a predição *in silico* dos possíveis epítopos de células B e T presentes na proteína PvCyRPA;
- Avaliar a reatividade de anticorpos IgG frente aos peptídeos sintéticos representando os epítopos de célula B selecionados na PvCyRPA;
- Identificar a resposta imune celular de indivíduos naturalmente expostos à infecção frente aos peptídeos sintéticos representando os epítopos de células T CD4 com maior score na predição *in silico*;
- Avaliar a relação entre a resposta epítipo-específica e os fatores de exposição/proteção nos indivíduos participantes do estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área e população de estudo

4.1.1 Área de estudo

A incidência da malária no Brasil está majoritariamente concentrada nos estados da Bacia Amazônica, com mais de 99% dos casos de malária. O Estado do Acre é o segundo estado brasileiro em número de casos, registrando em 2019 um total de 12.784 casos da doença, de acordo com os dados do Ministério da Saúde. Assim como outros estados brasileiros, o estado do Acre apresenta um quadro preocupante, onde ao longo dos anos ocorrem flutuações com redução e subsequente aumento do número de casos de malária. Nesta região, a malária não está homogeneamente distribuída, incidindo prioritariamente em populações vivendo em condições insatisfatórias de habitação e trabalho. Estas populações estão relacionadas à ocupação desordenada de terras, a projetos de assentamento e à intensa migração. Para este estudo escolhemos três áreas endêmicas pertencentes ao sudoeste da Amazônia e com alto índice parasitário anual nos últimos 5 anos.

4.1.2 População de estudo

Ao todo foram coletadas 90 amostras de sangue, PBMC e plasma de indivíduos naturalmente expostos à malária, residentes nos municípios de Cruzeiro do Sul (AC), Mâncio Lima (AC) e Guajará (AM), mediante a realização de trabalho de campo realizado entre junho e agosto de 2018 (Figura 11). Destas, 30 amostras correspondem a indivíduos infectados por *P. vivax* durante a coleta, 30 amostras correspondem a indivíduos naturalmente expostos à malária que apresentem infecções anteriores nos últimos 10 anos e 30 amostras de indivíduos expostos mas sem infecções anteriores nos últimos 10 anos. Além destes, 10 amostras de indivíduos provenientes de área não endêmica (Rio de Janeiro), sem histórico pregresso de exposição à malária foram utilizados como grupo controle. Embora não tenha sido possível calcular e coletar um N amostral representativo de toda a

população dos municípios estudados, as amostras coletadas (N=100) por conveniência são compatíveis com os demais trabalhos soroepidemiológicos e de resposta celular realizados em áreas endêmicas de malária.

4.1.3 Critério de inclusão de pacientes

Indivíduos com ou sem malária, residentes nas localidades acima descritas, que apresentaram ou não sintomas.

4.1.4 Critério de exclusão de pacientes

Foram excluídos do nosso estudo indivíduos provenientes de populações que precisam de solicitações específicas para a realização de estudos experimentais, como: indígenas, grupos religiosos, militares, presidiários, indivíduos que possuem psicopatologias, parturientes e gestantes, independente da idade e crianças com idade inferior aos 10 anos.

*** Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, CEP-FIOCRUZ): CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248**

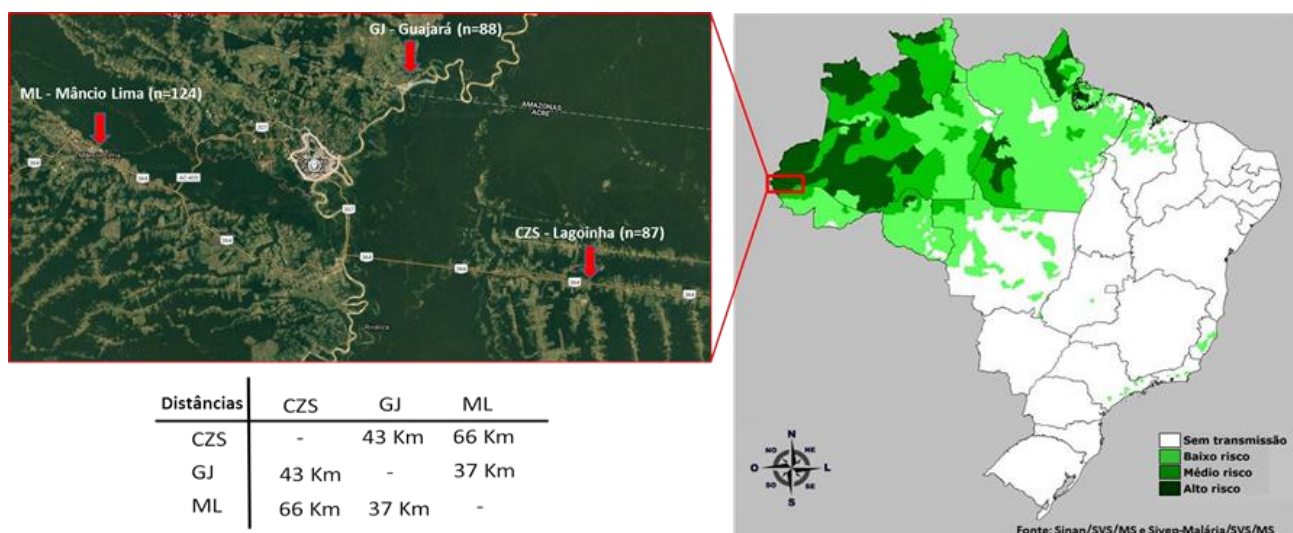


Figura 11: Localização dos municípios nos quais foram realizadas as coletas e entrevistas da população de estudo.

4.2 Obtenção de amostras e de dados epidemiológicos

4.2.1 Coleta de sangue

Os voluntários foram informados sobre o projeto de pesquisa e após aceitarem participar do estudo, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Em seguida, responderam oralmente a um questionário que visava à coleta de dados pessoais e epidemiológicos que foram depositados em um banco de dados. As informações fornecidas pelos participantes do estudo foram utilizadas em conjunto com os resultados experimentais obtidos a fim de identificar características epidemiológicas estatisticamente significativas desta população. A coleta de sangue (15 mL) foi realizada por punção venosa utilizando-se o sistema vacutainer. Ao todo foram utilizados dois tubos, o primeiro (10 mL) com heparina, utilizado para investigação da resposta imune celular e humoral (determinada por ensaios de ELISPOT e ELISA, respectivamente) e o segundo (5 mL) com EDTA, utilizado para a genotipagem do parasito e para o diagnóstico molecular por meio da técnica de PCR.

4.2.2 Coleta de dados epidemiológicos e demográficos

Todos os voluntários participaram de uma cuidadosa entrevista com o objetivo de preencher um questionário de investigação para a coleta de dados pessoais (nome, idade, sexo, profissão) e epidemiológicos (tempo de residência em área endêmica, número de infecções anteriores de malária, espécies previamente contraídas, tempo desde o último episódio de malária, entre outras) que foram utilizados nos estudos de correlação com os dados experimentais.

4.2.3 Extração de DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo do kit comercial QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi (QIAGEN, Valencia, CA, USA), utilizando apenas 1 mL de papa de hemácias de cada amostra.

4.2.4 Diagnóstico parasitológico e molecular de malária

O exame parasitológico foi realizado por distensão sanguínea e/ou gota espessa corada pelo Giemsa durante o trabalho de campo realizado em 2018 e as amostras também foram submetidas à amplificação por PCR para identificação da espécie plasmodial, por fim foi realizado o cruzamento entre os resultados do exame de gota espessa e os resultados moleculares obtidos com as amostras de cada participante (205).

4.3 Síntese do gene, clonagem e expressão da PvCyRPA recombinante

O gene sintético de aproximadamente 1500 pb foi adquirido comercialmente (Geneart, Thermo Fisher, Regensburg, Alemanha) utilizando a plataforma de tecnologia da própria empresa. A otimização de códons para expressão de genes em *E. coli* foi realizado usando o algoritmo GeneOptimizer com objetivo de obter altas taxas de expressão. A expressão da proteína quimérica PvCyRPA foi realizada

em colaboração com o Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz-PR) pelo grupo de pesquisa da Dra. Letusa Albretch (**Anexo I**).

4.4 Avaliação da reatividade de anticorpos IgM, IgG e Subclasses PvCyRPA específicos

A presença de anticorpos específicos para a proteína recombinante PvCyRPA foi avaliada nas amostras de soro por meio da técnica de ELISA. Placas de 96 poços foram sensibilizadas durante 24 h com 200 ng de antígeno. Após a sensibilização, foram lavadas 4X com PBS 0.05% tween 20 e bloqueadas com 200 µl de PBS tween 5% BSA filtrado durante 2h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez após o bloqueio e incubadas durante 1h a temperatura ambiente com soro diluído 1:100 em PBS tween 2,5% BSA, sendo cada soro testado em duplicata. Depois de lavar 4X, as placas foram incubadas durante mais 1h a temperatura ambiente com os anticorpos monoclonais anti-IgG e anti-IgM conjugado a peroxidase diluído em PBS tween 2,5% BSA. A revelação foi realizada após a lavagem das placas por 4X, com a incubação dos substratos (OPD) e peróxido de hidrogênio por 30 minutos a temperatura ambiente, de acordo com as instruções do fabricante. As densidades óticas (DOs) foram lidas a 490nm, e todos os valores acima da média somados a três vezes o desvio padrão (cut off) dos soros dos indivíduos sem histórico progresso de malária foram considerados positivos (índice de reatividade > 1). Após a realização dos ensaios, os indivíduos respondedores para IgG anti-PvCyRPA tiveram o soro testado para as diferentes subclasses de IgG, utilizando o mesmo protocolo descrito com a substituição da anti-IgG humana por anticorpos monoclonais produzidos em camundongos específicos para as subclasses de IgG; anti-IgG1 (Sigma, clone HP6001), Anti-IgG2 (6002), Anti-IgG3 (6050) e Anti-IgG4 humana (6023) e anticorpo anticamundongo conjugado a peroxidase diluído 1:1000.

4.5 Predição e obtenção de epítomos de Células B e T

4.5.1 Predição *in silico* e análise dos possíveis epítomos de células B

A sequência completa da proteína PvCyRPA foi analisada utilizando o algoritmo BepiPred presente no Immuno Epitope Database (IEDB) para a predição de propensão antigênica de potenciais epítomos lineares presentes nesta proteína, a partir dos diferentes scores fornecidos pelo software foram selecionados os epítomos mais promissores (206).

4.5.2 Predição *in silico* e análise dos possíveis epítomos de células T CD4

A sequência completa da proteína PvCyRPA foi analisada utilizando o IEDB, como ferramenta de análise (207) somado ao ANN aka NetMHC (3.4) (208, 209), SMM (210) e Comlib (211). Foram selecionados 10 peptídeos com os maiores scores de antigenicidade e ligação de HLA (foi utilizada como referência a lista de HLAs fornecida na própria ferramenta de predição).

4.5.3 Síntese química dos peptídeos

As sequências peptídicas baseadas nos epítomos de células B e T identificadas pelas estratégias utilizadas na predição, foram sintetizadas com pureza de 90-98% utilizando a metodologia de síntese em fase sólida (212) e adquiridas comercialmente (Genone Biotech). Análises de HPLC e espectrometria de massa foram realizadas em todos os peptídeos (**Anexo II**).

4.6 Confirmação dos epítomos preditos

4.6.1 Confirmação de epítomos de células B por ELISA

Os peptídeos sintetizados e liofilizados correspondendo às sequências de epítomos de células B preditas foram adquiridos comercialmente (WatsonBio) e a detecção dos anticorpos específicos será feita seguindo as instruções do ELISA fornecidas pelo fabricante. Portanto, a sobreposição dos resultados de predição com os resultados do ELISA de peptídeos nos confirmará as regiões mais promissoras da proteína PvCyRPA.

4.6.2 Confirmação de epítomos de células T e avaliação da resposta imune celular

O número relativo de células T específicas secretoras de IFN- γ foi quantificado por meio da técnica de ELISPOT. As placas de nitrocelulose foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-IFN- γ , após a sensibilização, as placas foram lavadas e bloqueadas com 100 μ l de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (meio completo). A partir do bloqueio, foram adicionados aos poços em duplicata, 100 μ l dos peptídeos sintéticos na concentração de 10 μ g/ml em meio RPMI completo; 100 μ l contendo 2×10^5 células mononucleares em meio RPMI completo, previamente isoladas por Ficoll. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO $_2$ durante 24h. Após esse período, foram adicionados 50 μ l por poço do anticorpo de detecção biotinilado anti IFN- γ nas placas que foram incubadas durante 4h a 37°C. Por fim, foram adicionados 50 μ l/poço de estreptavidina-ALP em PBS 1% SFB e para a revelação com NBT/BCIP. A aquisição das imagens das placas e a contagem do número de spots obtidos foi realizada no leitor de ELISPOT (ImmunoSpot®, modelo S6UV-ultra) da Plataforma de ELISPOT/PDTIS da Fiocruz.

4.7 Análises de dados

Os dados foram armazenados no banco de dados Epi-info (CDC, Atlanta) versão 3.2. e foi feita a análise estatística das diferenças entre os índices de reatividade e as frequências de respostas observadas. As correlações univariadas entre dados epidemiológicos e a resposta humoral foi feita pelo Programa Graph Pad. Prism 5.0, onde foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Teste de Mann Whitney, utilizado na comparação das medianas entre duas variáveis não pareadas; Teste de Spearman, utilizado na avaliação das correlações entre duas variáveis mensuradas ordinais, contínuas e do mesmo tamanho; Teste do qui-quadrado (X^2), para avaliar se as proporções observadas entre dois grupos são estatisticamente distintas. Por fim, análises multiparamétricas e multivariadas foram aplicadas para identificar as potenciais associações entre indicadores de proteção e exposição da população estudada com a resposta imune humoral e celular específicas contra a PvCyRPA.

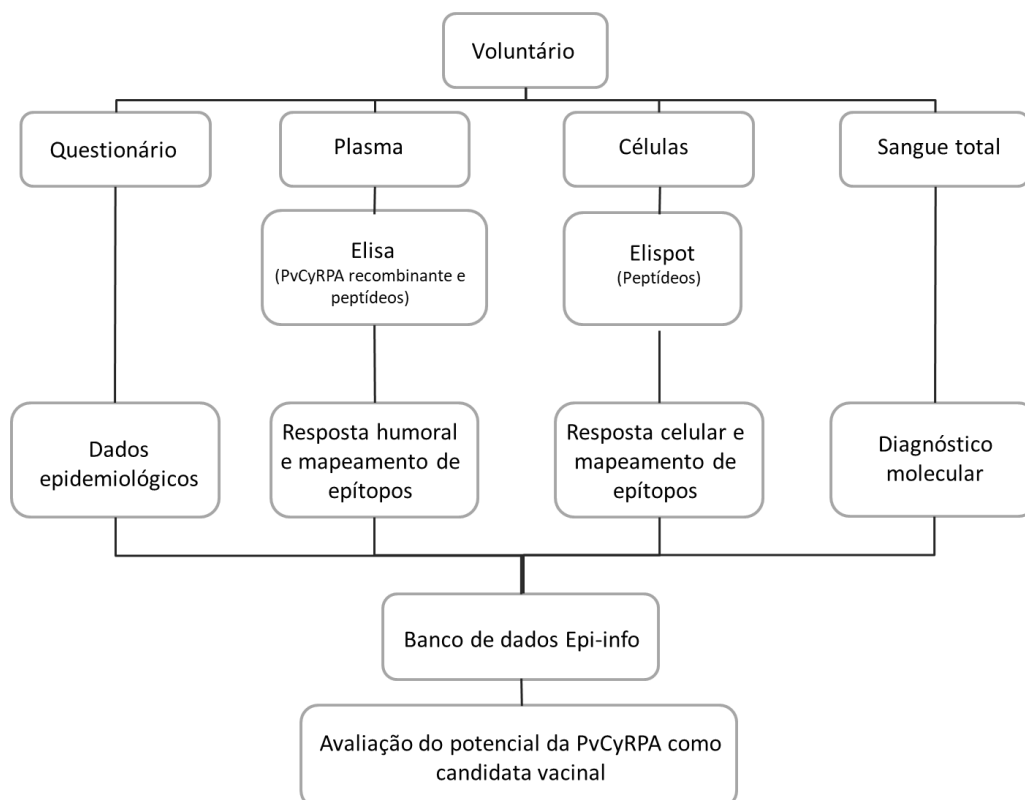


Figura 12: Desenho experimental do estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil clínico e epidemiológico da população naturalmente exposta à malária residente nas áreas de estudo

A população de estudo é composta por 100 indivíduos, dentre eles: 10 indivíduos de área não endêmica provenientes da cidade do Rio de Janeiro e 90 indivíduos provenientes de área endêmica, dos municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará. Desses 90 indivíduos, 30 indivíduos estavam infectados por *P. vivax* no momento da coleta - confirmados por gota espessa e PCR, 30 indivíduos foram classificados como expostos que relataram infecções anteriores de malária nos últimos 10 anos (Ex10) e 30 indivíduos expostos sem infecções nos últimos 10 anos (ExN10). A partir dos dados epidemiológicos coletados dos indivíduos provenientes de área endêmica (N=90) observou-se que 41 são do sexo masculino (45,6%) e 49 do sexo feminino (54,4%) com mediana de 28 anos (intervalo interquartil – IQ 20-37.8) e mediana de 29 anos residindo em área endêmica (IQ 20-38). Os indivíduos com histórico pregresso da doença (N=60) apresentaram mediana de 2 episódios anteriores de malária (IQ 0-5) e destes 52 (86,7%) relataram infecções anteriores por *P. vivax* (**Quadro 1**).

Quadro 1: Dados epidemiológicos da população proveniente de área endêmica.

Dados Epidemiológicos	(N=90)
Gênero	N (%)
Masculino	41 (45,6%)
Feminino	49 (54,4%)
Fatores de exposição à Malária	Mediana (IQ)
I.P.A	61,4
Idade (anos)	28 (20-37,8)
Tempo de residência em área endêmica	29 (20-38)
Tempo de residência no presente endereço	20 (12-34)
Meses desde a última malária	0 (0-17)
Número de episódios de malária no último ano	0 (0-1)
Número de episódios anteriores de malária	2 (0-5)
Espécies previamente contraídas	N (%)
<i>P. vivax</i>	14 (15,6%)
<i>P. falciparum</i>	4 (4,4%)
<i>P. vivax and P. falciparum</i>	38 (42,2%)
Sem infecções nos últimos 10 anos	30 (33,3%)
Não reportado	4 (4,4%)
Diagnóstico (gota espessa e PCR)	N (%)
<i>P. vivax</i>	30 (33,3%)
<i>P. falciparum</i>	0 (0%)
Misto	0 (0%)
Negativo	60 (66,7%)

IPA = Índice Parasitário Anual. Neste quadro não foram incluídos os indivíduos controle provenientes de área não endêmica (N=10).

5.2 Reatividade de anticorpos IgM e IgG de indivíduos naturalmente expostos à malária frente a PvCyRPA recombinante

As amostras de soro dos 100 indivíduos foram testadas frente à PvCyRPA recombinante. As densidades ópticas (DO's) obtidas no grupo controle proveniente de área não endêmica (N=10) apresentaram mediana de 0,079, variando de 0,062 a 0,126 para anticorpos IgM anti-PvCyRPA e DO's com mediana de 0,215 variando de 0,090 a 0,298 para anticorpos IgG anti-PvCyRPA. A partir da média das DO's somada a 3 desvios padrão dos indivíduos do grupo controle foram calculados os índices de reatividade (IR's) dos indivíduos provenientes de área endêmica (N=90).

Indivíduos que apresentaram IR's com valores superiores a 1 para anticorpos IgM ou IgG anti-PvCyRPA foram considerados respondedores. Nas 90 amostras provenientes de área endêmica foram observadas frequências semelhantes de indivíduos respondedores para os anticorpos IgM anti-PvCyRPA (n=42; 46.7% de respondedores) e IgG anti-PvCyRPA (n=45; 50% de respondedores) (**figura 13a**). Não houve diferença significativa entre os índices de reatividade (IR's) desses anticorpos (IgM - IR com mediana de 0.958, variando de 0.393 a 7.353; IgG - IR com mediana de 0.959, variando de 0.229 a 5.089) (**figura 13b**). Ao todo, desses 90 indivíduos provenientes de área endêmica, 23 foram respondedores tanto para anticorpos IgM anti-PvCyRPA como para anticorpos IgG anti-PvCyRPA (17 infectados, 5 Ex10 e 1 ExN10) e 26 indivíduos não foram respondedores para nenhum desses anticorpos (3 infectados, 13 Ex10 e 10 ExN10).

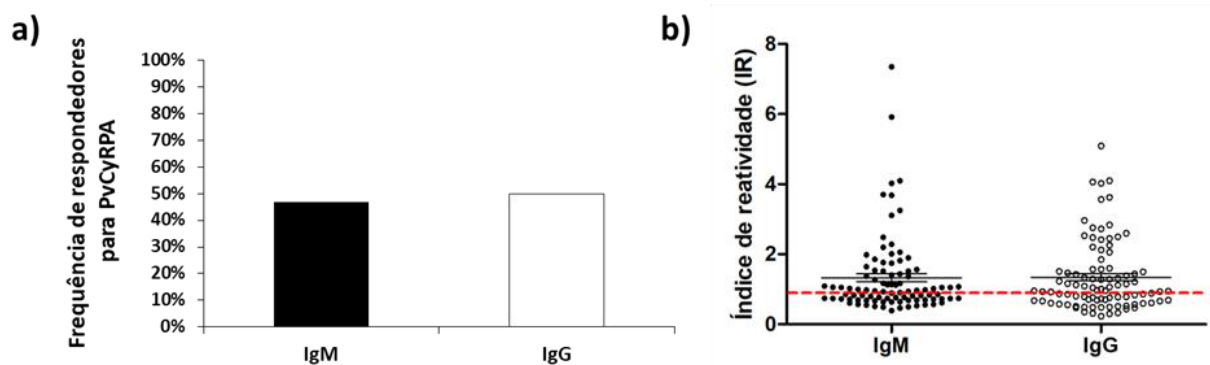


Figura 13: Resposta de anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA. (a) Frequência de indivíduos respondedores para anticorpos IgM e IgG. (b) Índices de reatividade de anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA. A linha tracejada em vermelho corresponde a 1, indivíduos que apresentem IR's superiores a este valor são considerados respondedores.

Em seguida, foram comparados os indivíduos respondedores para anticorpos IgM anti-PvCyRPA dos indivíduos não respondedores para anticorpos IgM anti-PvCyRPA. Um maior número de episódios de malária no último ano (mediana 0, IQ 0-2) foi observado nos respondedores em relação aos não respondedores (mediana 0, IQ 0-0) ($p=0.0112$), além disso, respondedores para anticorpos IgM anti-PvCyRPA também apresentaram número inferior de meses desde a última malária (mediana 0,

IQ 0-0) em relação aos não respondedores (mediana 12, IQ 6-25) ($p < 0.0001$) . Entre indivíduos respondedores e os não respondedores para anticorpos IgG anti-PvCyRPA não houve diferenças estatísticas.

Analisando os grupos provenientes de área endêmica separadamente (infectados, Ex10 e ExN10), foi observada uma frequência superior de indivíduos respondedores para IgM no grupo dos indivíduos infectados (N=30), onde 26 indivíduos (86.7%) foram respondedores para a PvCyRPA em comparação a apenas 8 indivíduos respondedores (26.7%) em cada um dos outros grupos de indivíduos expostos (Ex10 N=30 e ExN10 N=30) ($p < 0,0001$) e ao grupo controle de indivíduos não expostos (N=10) ($p < 0,0001$) que não apresentou respondedores para tais anticorpos. No caso dos anticorpos IgG anti-PvCyRPA as frequências permaneceram semelhantes entre os grupos investigados, com 18 indivíduos respondedores (60%) no grupo de infectados (N=30), 14 indivíduos respondedores (46,7%) no grupo Ex10 (N=30) e 13 indivíduos respondedores (43,3%) no grupo ExN10 (N=30). Todos estes grupos apresentaram frequências superiores ao grupo controle não exposto (N=10) onde nenhum indivíduo foi respondedor para anticorpos IgG anti-PvCyRPA ($p = 0,0008$, $p = 0,0075$ e $p = 0,0164$, respectivamente). Ao comparar as frequências de respondedores para anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA em cada grupo, observou-se uma maior frequência de respondedores para anticorpos IgM anti-PvCyRPA no grupo dos infectados (N=30) em comparação a frequência de respondedores para anticorpos IgG anti-PvCyRPA deste mesmo grupo ($p = 0,0391$). Ao compararmos os IR's de anticorpos IgM anti-PvCyRPA em cada grupo, verificou-se que os IR's do grupo de infectados (N=30) foi superior aos IR's dos 2 grupos expostos (Ex10 N=30 e ExN10 N=30) ($P < 0,0001$). No caso dos anticorpos IgG anti-PvCyRPA não foram observadas tais diferenças. Para ambos os anticorpos, IgM e IgG anti-PvCyRPA, tanto o grupo de indivíduos infectados como os grupos expostos Ex10 e ExN10 apresentaram IR's superiores aos IR's encontrados no grupo dos indivíduos controle não expostos (N=10) ($P < 0,0001$) (**figuras 14a e 14b**).

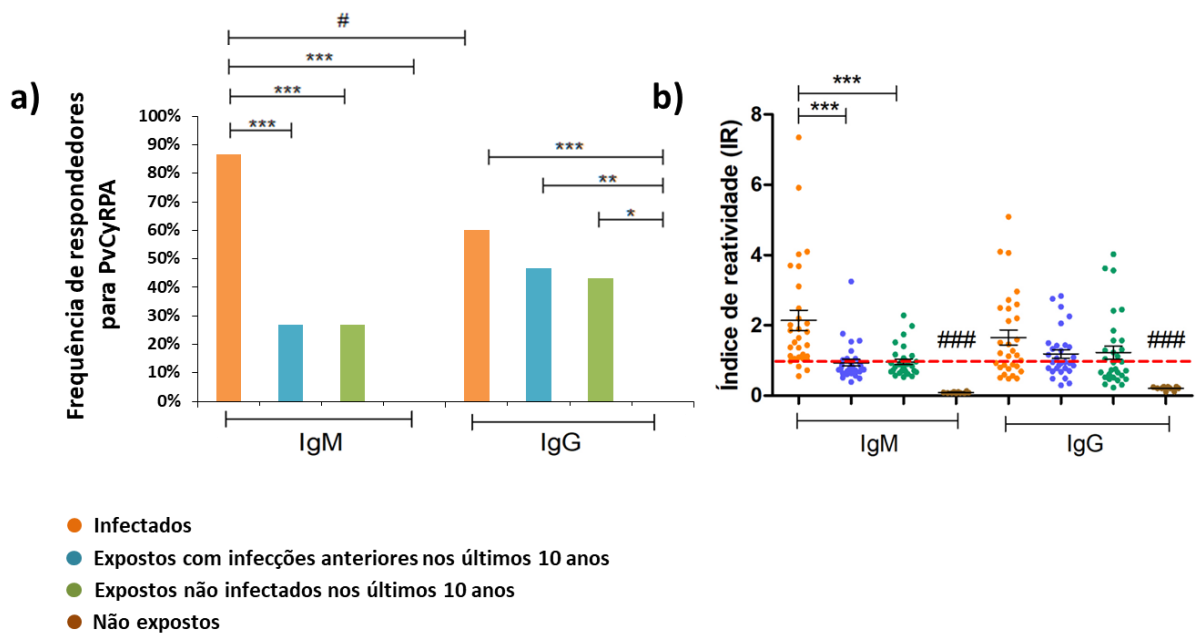


Figura 14: Resposta de anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA divididos por grupo. (a) Frequência de indivíduos respondedores para anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA por grupo. (b) Índices de reatividade de anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA induzidos por grupo. A linha tracejada em vermelho corresponde a 1, indivíduos que apresentem IR's superiores a este valor são considerados respondedores. Os asteriscos indicam os valores de p: (*) $p < 0.05$; () $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$. As cerquilhas são equivalentes, porém indicam diferença estatística em comparação a todos os grupos analisados.**

5.3 Frequência e magnitude das subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) específicas para PvCyRPA nos indivíduos respondedores

Em seguida, investigamos as subclasses de anticorpos IgG anti-PvCyRPA produzidas nos indivíduos respondedores para anticorpos IgG anti-PvCyRPA (N=45). O perfil de subclasses de anticorpos IgG anti-PvCyRPA observado demonstrou que: As frequências encontradas foram de 62,2% (N=28) para anticorpos IgG1, de 44,4% (N=20) para anticorpos IgG2, de 55,6% (N=25) para anticorpos IgG3 e de 2,2% para anticorpos IgG4 (N=1). Não houve diferenças estatísticas entre as frequências das 3 primeiras subclasses de anticorpos descritas, porém, todas estas apresentaram frequências de indivíduos respondedores superiores em relação a subclasse IgG4 ($p < 0,0001$) (**figura 15a**). Em relação aos IR's, indivíduos que apresentaram anticorpos IgG1 anti-PvCyRPA apresentaram

mediana de 1,480 (IQ 0,905-2,892), enquanto aqueles que apresentaram anticorpos IgG2 anti-PvCyRPA tiveram mediana de 1,217 (IQ 0,833-2,083) e os que apresentaram IgG3 anti-PvCyRPA uma mediana de 1,244 (IQ 0,793-1,985). Os IR's destas subclasses foram superiores quando comparados aos IR's de anticorpos IgG4 anti-PvCyRPA que apresentaram mediana de 0,341 (IQ 0,287-0,443) (**figura 15b**).

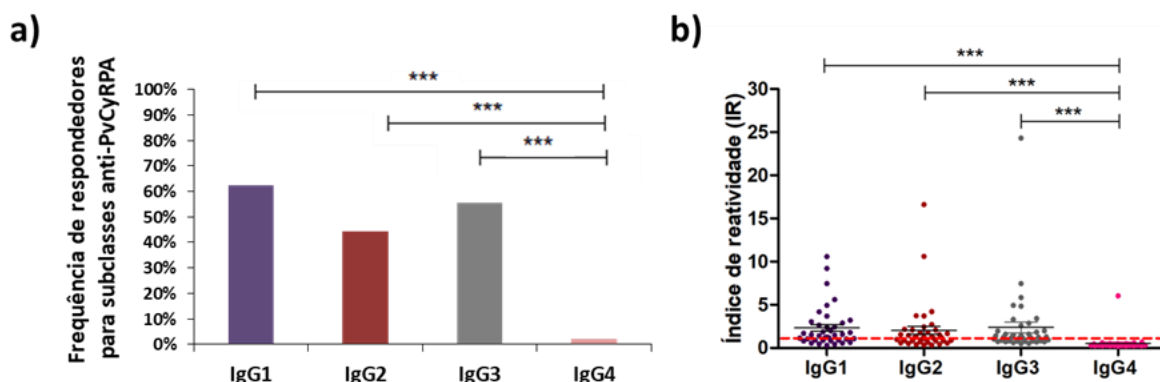


Figura 15: Perfil de subclasses de IgG anti-PvCyRPA. (a) Frequência de indivíduos respondedores para as subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. (b) Índices de reatividade de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 frente a proteína PvCyRPA recombinante. A linha tracejada em vermelho corresponde a 1, indivíduos que apresentem IR's superiores a este valor são considerados respondedores. Os asteriscos indicam os valores de p: (*) $p < 0.05$; () $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$.**

5.4 Relação entre a resposta humoral observada e os fatores de exposição/proteção nos indivíduos participantes do estudo

A fim de correlacionar a resposta de anticorpos IgM e IgG anti-PvCyRPA observada com fatores de exposição/proteção foram realizadas análises combinando os IR's dos anticorpos observados e os dados epidemiológicos obtidos dos indivíduos provenientes de área endêmica (N=90). Nesse contexto, foi identificada uma correlação inversa entre os IR's de anticorpos IgM anti-PvCyRPA e o número de meses desde a última malária ($p < 0.0001$ e $r = -0.6066$) (**figura 16a**) assim como uma correlação direta com o número de episódios de malária no último ano ($p = 0.0226$ e $r = 0.2457$) (**figura 16b**).

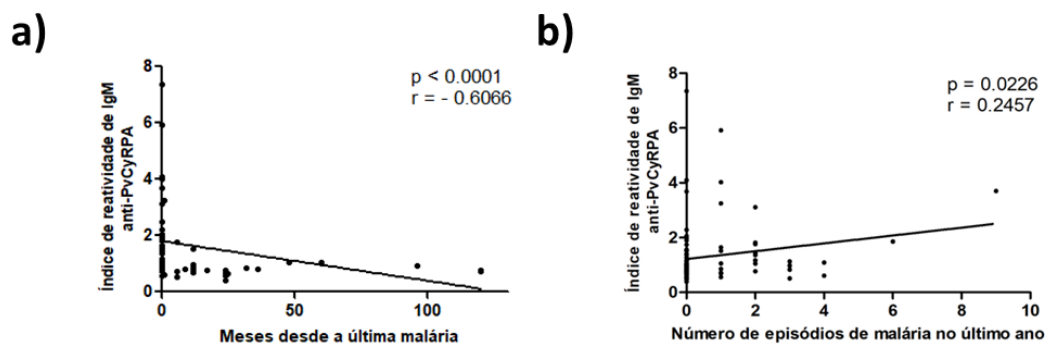


Figura 16: Correlação de índices de reatividade de anticorpos IgM anti-PvCyRPA com fatores de exposição/proteção.

Combinando os IR's de anticorpos IgG anti-PvCyRPA e os dados epidemiológicos desta mesma população não foram identificadas correlações estatisticamente significativas. No entanto, no caso das subclasses de anticorpos IgG anti-PvCyRPA, observou-se que anticorpos IgG3 anti-PvCyRPA apresentaram correlação direta tanto com o tempo de residência no presente endereço ($p=0,0500$ e $r=0,3739$), como com o número de episódios anteriores de malária ($p=0,0381$ e $r=0,3743$) (**figuras 17a e 17b**). Interessantemente, os IR's de anticorpos IgG1 anti-PvCyRPA apresentaram tendência de correlação com o número de meses desde a última malária ($p=0,0673$ e $r= -0,3573$) (**figura 17c**).

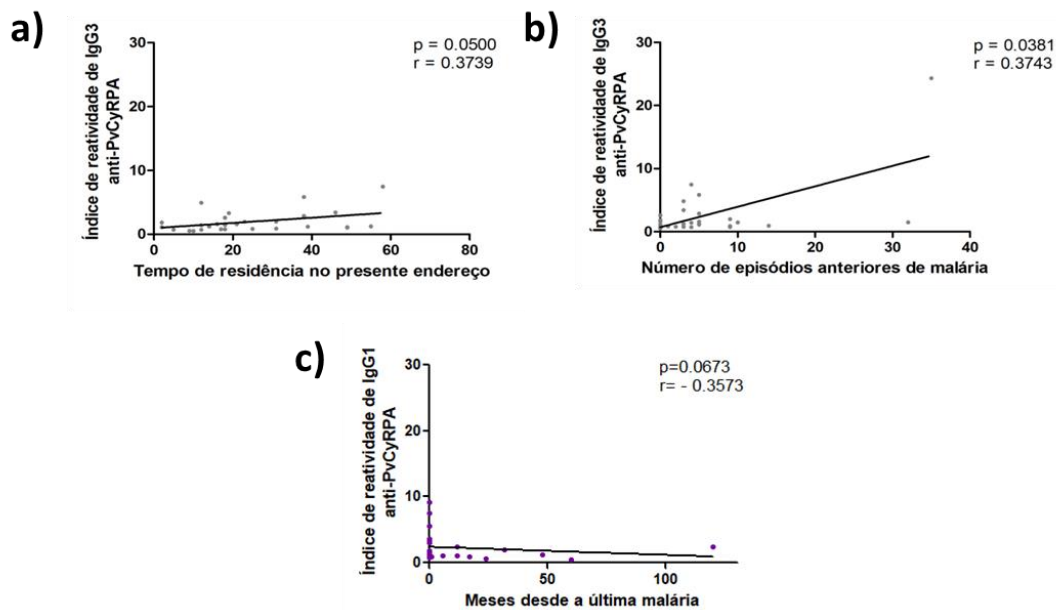


Figura 17: Correlação dos índices de reatividade de anticorpos citofílicos anti-PvCyRPA com fatores de exposição/proteção.

5.5 Predição *in silico* dos possíveis epítomos de células B e T presentes na proteína PvCyRPA

Para a realização da predição foi utilizada uma combinação dos resultados obtidos a partir de diferentes ferramentas de predição. Na identificação de epítomos lineares de células B, foram selecionadas sete sequências capazes de ser preditas por pelo menos três destas cinco ferramentas. As sequências variaram de 9 a 19 aminoácidos e a maioria dessas sequências (N=5) se encontra inserida em epítomos conformacionais contínuos, com exceção das sequências PvCyRPA B2 e PvCyRPA B3 (**tabela 1**). A partir da predição, as sequências correspondendo aos epítomos de células B foram sintetizadas e obtidas comercialmente sob a forma de peptídeos.

Sequência	Nome	Início	Fim	Tamanho	Predição sobreposta				
					Ellipro	Bcpred	BepiPred	ABCpred	EMINI
INSTWETQTTL	B1	58	68	11	X	X	X	X	-
YKQRSKREGTI	B2	96	106	11	X	-	X	X	X
NSVTGTIIYQKEDVQIDKE	B3	111	128	18	X	X	X	X	X
SYEYKTANKDNF	B4	158	169	12	X	-	X	-	X
RISTNNTAR	B5	218	226	9	X	X	X	-	-
TLDVTNEGKKEYKFKC	B6	234	249	16	X	X	-	-	X
TEQNAIIVVKPKVQNDLNG	B7	289	307	19	X	X	-	X	-

Tabela 1: Características dos epítomos de células B selecionados e dos algoritmos utilizados capazes de prever cada uma das sequências.

Na predição de epítomos de células T CD4, foram selecionadas dez sequências na PvCyRPA, sendo todas essas sequências capazes de reconhecer pelo menos 60% dos mais comuns HLAs circulantes no mundo (**tabela 2**). A partir do resultado desta predição, os peptídeos foram sintetizados e obtidos comercialmente e organizados em pools para a realização dos ensaios de ELISPOT. Ao todo foram criados cinco pools, onde cada um desses pools continha quatro das sequências identificadas na predição. Os pools do um ao pool quatro foram construídos obedecendo a sequência e organização original da proteína, com quatro peptídeos cada, e sobreposição de dois peptídeos correspondendo as duas últimas sequências do pool anterior, a fim de cobrir toda a extensão da PvCyRPA. Já o pool cinco foi construído baseado nas quatro sequências com maior frequência de reconhecimento de alelos de HLA (PvCyRPA T1, PvCyRPA T3, PvCyRPA T5 e PvCyRPA T9). Foi criado ainda um pool extra, denominado megapool, contendo todos os dez peptídeos identificados como demonstrado na tabela 3.

Seqüência	Ínicio	Fim	Número de alelos de HLA ligantes	Mediana classificação percentil
T1	49	63	20 (74%)	4,2
T2	54	68	17 (63%)	10,7
T3	102	116	20 (74%)	7,1
T4	167	181	18 (67%)	7,5
T5	216	230	20 (74%)	6,5
T6	221	235	18 (67%)	8,1
T7	232	246	17 (63%)	4,6
T8	287	301	18 (67%)	11,5
T9	306	320	21 (78%)	7
T10	340	354	17 (63%)	8,6

Tabela 2: Características dos epítomos de células T selecionados na predição para realização de ensaios de ELISPOT.

Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Megapool
T1	T3	T5	T7	T1	Todos os peptídeos!
T2	T4	T6	T8	T3	
T3	T5	T7	T9	T5	
T4	T6	T8	T10	T9	

Tabela 3: Organização dos peptídeos correspondentes aos epítomos de células T nos pools utilizados nos ensaios de ELISPOT.

Organizando toda a sequênciada proteína PvCyRPA foram destacadas as regiões identificadas nas duas predições previamente realizadas e verificou-se uma importante sobreposição de epítomos de células B e T ao longo de sua estrutura (figura 18).

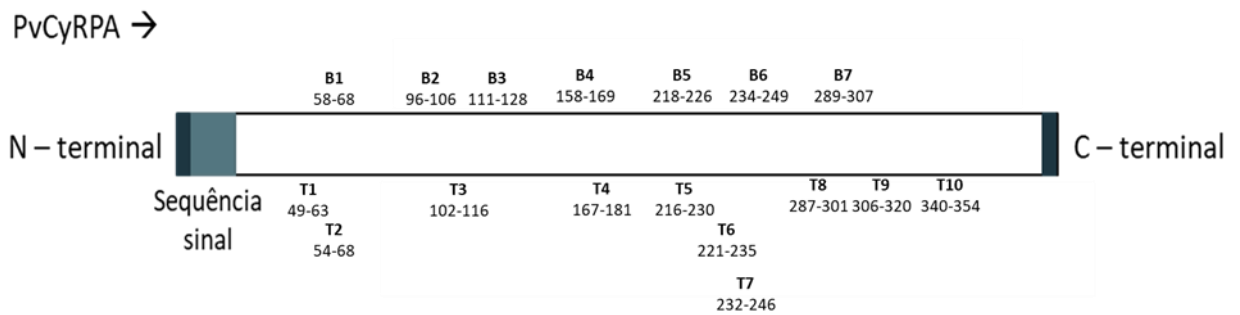


Figura 18: Representação da localização dos epítomos B e T indentificados na proteína PvCyRPA.

5.6 Resposta imune celular de indivíduos naturalmente expostos à infecção frente aos peptídeos sintéticos representando epítomos de células T

Utilizando os peptídeos sintéticos correspondentes as sequências de epítomos de células T CD4 preditas foram realizados ensaios de ELISPOT. No grupo dos indivíduos infectados (N=30), 15 indivíduos (50%) apresentaram unidades formadoras de spots (UFS) para pelo menos um dos pools testados (os resultados variaram de 20,5 a 370 UFS). Dos 15 indivíduos capazes de produzir $INF\gamma$ frente aos diferentes peptídeos investigados, 60% (n=9) produziram $INF\gamma$ quando em contato com os peptídeos presentes no pool 2 (mediana de 37.5 spots), em comparação com 26,7% (n=4) para o pool 1 (mediana de 28.25 spots), 20% (n=3) para o pool 3 (mediana de 48.5 spots), 30% (n=5) para o pool 4 (mediana de 31.5 spots), 26,7% (n=4) para o pool 5 (mediana de 40.5 spots) e 46,7% (n=7) para o megapool (mediana de 34.5 spots). No entanto, não houve diferenças estatísticas entre as frequências e os números de UFS encontrados para cada um dos pools testados (**figura 19a e 19b**).

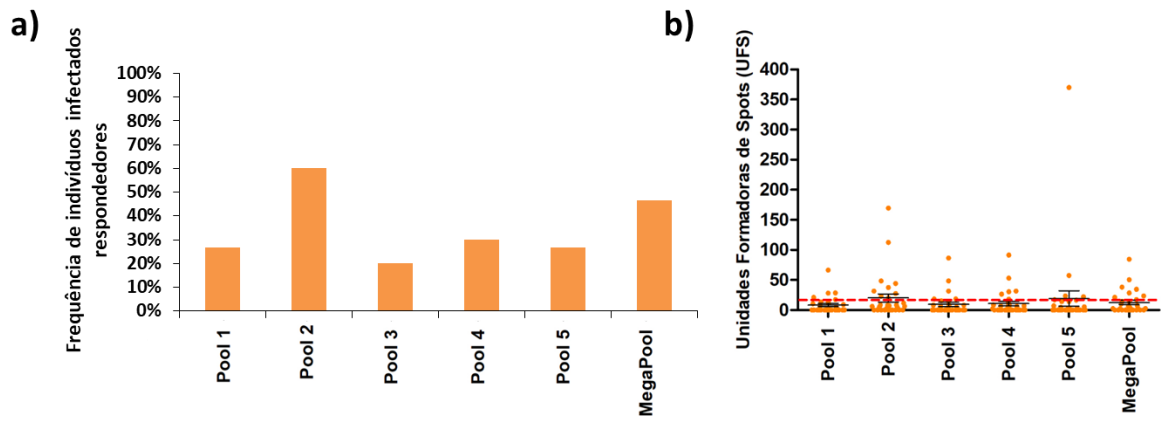


Figura 19: Resposta imune celular observada frente aos pools contendo os epítomos T preditos. (a) Frequência de respondedores para os diferentes pools contendo combinações de epítomos T (b) Quantidades de unidades formadoras de spots (UFS) induzidas frente aos diferentes pools testados. A linha tracejada em vermelho indica o valor de 20 UFS, indivíduos produtores de UFS superiores a esta marca foram considerados produtores de INF γ .

6 DISCUSSÃO

A população utilizada no estudo consistiu em 90 indivíduos naturalmente expostos à malária, majoritariamente a malária causada por *P. vivax*, com mediana de 2 episódios anteriores da doença e que residiram ao longo de toda a sua vida em área endêmica. Considerando estas amostras, observou-se que 47,5% desta população apresenta anticorpos IgM anti-PvCyRPA e que 50% apresenta anticorpos IgG anti-PvCyRPA, não havendo diferença estatística entre estas frequências. Até o momento, não existe na literatura científica trabalhos que investiguem a resposta imune natural desencadeada por PvCyRPA. No entanto, existem poucas pesquisas destinadas à *P. falciparum* que indicaram que a proteína é pouco imunogênica. De acordo com estudos desenvolvidos utilizando amostras de pacientes provenientes de regiões do Gana com elevada transmissão de malária as frequências de anticorpos IgG anti-PfCyRPA variaram de 0 a 11,5% (187, 213), em comparação a estes estudos as frequências de anticorpos IgG anti-PvCyRPA obtidas neste trabalho foram relativamente superiores.

Não foram observadas diferenças estatísticas em relação às características epidemiológicas da população quando comparados os indivíduos respondedores dos não respondedores para anticorpos IgG anti-PvCyrRPA. No entanto, no caso dos anticorpos IgM anti-PvCyRPA, os indivíduos respondedores apresentaram um número superior de episódios de malária no último ano (NEMUA) assim como um número inferior de meses desde a última malária (MDUM). Além disso, os resultados indicaram uma correlação direta entre os IR's de IgM anti-PvCyRPA e NEMUA ($p=0.0226$ e $r=0.2457$), assim como uma correlação inversa com MDUM ($p<0.0001$ e $r=-0.6066$), que podem ser importantes levando em consideração o N amostral reduzido desse trabalho. Juntos, tais dados sugerem que a presença de anticorpos IgM anti-PvCyRPA é um possível indicativo de infecções recentes. Até o momento, não existem estudos na literatura científica que investiguem a resposta de anticorpos IgM anti-CyRPA no caso de *P. vivax* ou de *P. falciparum*. Apesar disso, anticorpos IgM já foram destacados em um importante mecanismo de inibição da invasão de eritrócitos a partir da ativação e fixação de complemento na superfície de merozoítas. Ensaio utilizando CHMI com *P. falciparum* em indivíduos nunca infectados, demonstraram que a indução de anticorpos IgM contra as proteínas de merozoítas MSP-2, AMA-1 e EBA175 ocorre entre os dias 14 e 30 após a inoculação

dos parasitos. Nesse mesmo trabalho também foi demonstrado que em indivíduos provenientes de áreas endêmicas de malária os níveis de IgM induzidos contra proteínas de merozoítas permanecem detectáveis até 12 meses após infecções causadas por *P. falciparum* (214).

Quando os resultados obtidos foram separados de acordo com os grupos estudados (infectados, Ex10 e ExN10), verificou-se tanto frequências como IR's superiores de anticorpos IgM anti-PvCyRPA no grupo dos pacientes infectados quando comparados aos outros 2 grupos contendo os pacientes expostos. Este resultado em combinação com os resultados anteriormente descritos da diferença das medianas de NEMUA e MDUM entre respondedores e não respondedores para IgM anti-PvCyRPA, reforçam a possibilidade de que IR's elevados de IgM anti-PvCyRPA atuem como indicadores tanto de infecções em curso como de infecções recentes.

Após a determinação do perfil das subclasses de anticorpos IgG anti-PvCyRPA induzido, verificaram-se frequências e IR's semelhantes entre as subclasses de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3. Apesar disso, é interessante destacar a elevada frequência de anticorpos IgG1 e IgG3 encontradas (62,2% e 55,6% respectivamente), sendo tais anticorpos citofílicos as principais subclasses identificadas em um estudo com a PfCyRPA (213) além de serem amplamente descritos na literatura científica como protetores para a malária (215-219). Além disso, os resultados indicaram uma tendência de correlação entre os IR's de anticorpos IgG3 anti-PvCyRPA com o tempo de residência no presente endereço (TRPE) ($p=0.0500$ e $r=0.3739$), assim como uma correlação direta com o número de episódios anteriores de malária (NEM) ($p=0.0381$ e $r=0.3743$). Tais dados estão de acordo com o que é amplamente descrito na resposta imune identificada como protetora contra a malária, de que é necessária uma exposição contínua ao longo de anos e sucessivas infecções a fim de induzir anticorpos protetores (218, 220-222).

Utilizando diferentes ferramentas de predição combinadas a fim de refinar os resultados da predição, foram selecionadas sete sequências de epítomos lineares de células B presentes na PvCyRPA e dez sequências correspondentes à epítomos de células T CD4. Após a análise da estrutura da proteína e das diferentes regiões onde estas sequências estão inseridas, é interessante destacar a sobreposição que ocorre de diferentes epítomos de células B e T CD4, especialmente em dois blocos da proteína. O primeiro bloco parte do aminoácido 49 ao 181 e o segundo do aminoácido 218 ao 320, demonstrando que a PvCyRPA apresenta regiões capazes

de induzir tanto uma resposta imune humoral quanto uma resposta imune celular. Tal característica desta proteína é extremamente favorável para a indução de uma resposta imunológica complexa (envolvendo tanto a produção de anticorpos como ações mediadas por células T CD4), sendo esta uma condição promissora para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária (223-226).

Por fim, as diferentes sequências de epítomos de células T preditas foram organizadas em pools e testadas em ensaios de ELISPOT a fim de quantificar a produção de INF- γ no grupo dos indivíduos infectados por *P. vivax* (N=30). Todos os pools testados nos ensaios de ELISPOT foram capazes de induzir a produção de INF- γ em diferentes níveis. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de unidades formadoras de spots (UFS) nos 15 indivíduos (50%) capazes de produzir INF- γ frente às diferentes combinações de epítomos de células T CD4 utilizadas. Apesar disso, é interessante destacar que nos ensaios de ELISPOT, os pools 2, 3 e 5, apresentaram as maiores medianas observadas e compartilham entre si uma única sequência em comum que corresponde ao epítomo T5, sequência inserida no bloco mais próximo a porção C-terminal da proteína. Esses resultados sugerem que o bloco dos aminoácidos 218 ao 320, já destacado como uma região rica em epítomos B e T, no qual o epítomo T5 está inserido, consiste em uma promissora porção da PvCyRPA para compor uma vacina isoladamente ou em combinação com outros antígenos contra *P. vivax*.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pretendemos durante o doutorado finalizar os ensaios de ELISPOT já iniciados nos grupos de indivíduos expostos (Ex10 N=30 e ExN10 N=30). Além disso, será realizada a investigação dos peptídeos de maneira isolada a partir da seleção dos pools mais promissores. Iniciaremos também os ensaios de ELISA utilizando os peptídeos sintéticos correspondentes aos epítomos de células B em toda população proveniente de área endêmica (N=90). Tais ensaios não puderam ser concluídos em função do isolamento social determinado frente à pandemia do Covid-19. A partir desses dados poderemos confirmar a antigenicidade e imunogenicidade dos epítomos identificados na predição de epítomos de células B e T CD4 realizada, assim como as regiões mais promissoras da proteína PvCyRPA. Os resultados dos ensaios utilizando a proteína PvCyRPA recombinante e seus epítomos de células B e T obtidos no mestrado serão finalizados e utilizados ao longo do doutorado na construção de uma vacina híbrida de estágio eritrocítico em conjunto com as proteínas PvEBP e PvRipr.

8 CONCLUSÕES

A partir da detecção da produção de anticorpos anti-PvCyRPA (IgM, IgG e subclasses) mediante ensaios de ELISA com a proteína recombinante constatou-se que a PvCyRPA é naturalmente imunogênica na população de estudo. Os níveis de anticorpos IgM produzidos contra esta proteína parecem representar um indicativo de infecções recentes nessa população. A proteína PvCyRPA apresenta regiões com importante sobreposição de epítomos B e T. Nos ensaios iniciais de ELISPOT, todos os peptídeos correspondentes aos epítomos de células T CD4 presentes na PvCyRPA foram capazes de induzir a produção de INF- γ . Dentre eles, destaca-se o epítomo T5 presente na região C-terminal da proteína. Por fim, os dados obtidos neste trabalho correspondem aos primeiros relatos da resposta imune contra a PvCyRPA em populações brasileiras e reforçam o potencial desta proteína para compor uma vacina contra o *P. vivax*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arbeitskreis Blut U. Malaria. Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 2009;36(1):48-60.
2. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne. 2004;170(11):1693-702.
3. Nerlich A. Paleopathology and Paleomicrobiology of Malaria. Microbiology spectrum. 2016;4(6).
4. Nerlich AG, Schraut B, Dittrich S, Jelinek T, Zink AR. Plasmodium falciparum in ancient Egypt. Emerging infectious diseases. 2008;14(8):1317-9.
5. Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, et al. Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. Jama. 2010;303(7):638-47.
6. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. Clinical microbiology reviews. 2002;15(4):564-94.
7. Bogdonoff MD CJ, Good RA, McGovern JP, Nuland SB, Saffon MH. The Genuine Work of Hippocrates - Classics of Medicine Library. Birmingham, AL1985. 6,7,24-6; Aphorisms 3.1,2;4.59,63; On Airs, Waters and Places c. 10 p.
8. Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. The American journal of the medical sciences. 2010;340(6):492-8.
9. Laveran A. Traité des fièvres palustres : avec la description des microbes du paludisme. Paris1884.
10. Schlagenhauf P. Malaria: from prehistory to present. Infectious disease clinics of North America. 2004;18(2):189-205, table of contents.
11. R R. The role of the mosquito in the evolution of the malaria parasite. The Lancet Infectious diseases. 1898;II:489.
12. Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. Malaria journal. 2013;12:232.
13. Stephen L Hoffman CCKC, Nicholas J white. Tropical Infectious Diseases. Third edition ed2011. 1156 p.
14. Ramasamy R. Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. Frontiers in public health. 2014;2:123.
15. Gerald L Mandell JEB, Douglas J R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Eighth edition ed2015. 4320 p.
16. Rutledge GG, Bohme U, Sanders M, Reid AJ, Cotton JA, Maiga-Ascofare O, et al. Plasmodium malariae and P. ovale genomes provide insights into malaria parasite evolution. Nature. 2017;542(7639):101-4.
17. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. Parasites & vectors. 2012;5:69.
18. Thellier M, Simard F, Musset L, Cot M, Velut G, Kendjo E, et al. Changes in malaria epidemiology in France and worldwide, 2000-2015. Medecine et maladies infectieuses. 2020;50(2):99-112.
19. Organization WH. World Malaria Report 2016. 2016.
20. Organization WH. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. 2020.
21. Nkumama IN, O'Meara WP, Osier FHA. Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination. Trends in parasitology. 2017;33(2):128-40.
22. Dhiman S. Correction to: Are malaria elimination efforts on right track? An analysis of gains achieved and challenges ahead. Infectious diseases of poverty. 2019;8(1):19.

23. White NJ. Antimalarial drug resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(8):1084-92.
24. Korenromp EL, Williams BG, Gouws E, Dye C, Snow RW. Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. *The Lancet Infectious diseases*. 2003;3(6):349-58.
25. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7(7).
26. de Ridder S, van der Kooy F, Verpoorte R. Artemisia annua as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. *Journal of ethnopharmacology*. 2008;120(3):302-14.
27. Organization WH. WHO briefing on Malaria Treatment Guidelines and artemisinin monotherapies. Geneva: 2006.
28. Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *The New England journal of medicine*. 2008;359(24):2619-20.
29. Huang F, Takala-Harrison S, Jacob CG, Liu H, Sun X, Yang H, et al. A Single Mutation in K13 Predominates in Southern China and Is Associated With Delayed Clearance of Plasmodium falciparum Following Artemisinin Treatment. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(10):1629-35.
30. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *The New England journal of medicine*. 2014;371(5):411-23.
31. Organization GMP-WH. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy. 2018.
32. Zawawi A, Alghanmi M, Alsaady I, Gattan H, Zakai H, Couper K. The impact of COVID-19 pandemic on malaria elimination. *Parasite epidemiology and control*. 2020;11:e00187.
33. Organization WH. The potential impact of health service disruptions on the burden of malaria: a modelling analysis for countries in sub-Saharan Africa. Geneva: 2020.
34. Menkin-Smith L, Winders WT. Plasmodium Vivax Malaria. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2020.
35. Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of Plasmodium vivax malaria. *Journal of vector borne diseases*. 2018;55(1):1-8.
36. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17050.
37. Langhi DM, Jr., Bordin JO. Duffy blood group and malaria. *Hematology*. 2006;11(5):389-98.
38. Saúde SdVe, Saúde Md. Boletim epidemiológico malária 2020. 2020 9352-7864.
39. Carlos BC, Rona LDP, Christophides GK, Souza-Neto JA. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. *Pathogens and global health*. 2019;113(1):1-13.
40. Multini LC, Marrelli MT, Beier JC, Wilke ABB. Increasing Complexity Threatens the Elimination of Extra-Amazonian Malaria in Brazil. *Trends in parasitology*. 2019;35(6):383-7.
41. Saúde Md, Saúde SdVe. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM. Brasília DF2003. p. 132.
42. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria journal*. 2016;15(1):284.
43. Alisson F, Barbieri DOSaBSS-F. Population and Land Use Effects on Malaria Prevalence in the Southern Brazilian Amazon. *Human Ecology*. 2005;33(6):28.
44. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(6):701-18.

45. Neto SAJJAF. Symptomless *Plasmodium vivax* parasitemias and malaria eradication in Santa Catarina State, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1971;5:15.
46. de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suarez-Mutis MC, Santelli AC, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):618-33.
47. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. 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*. 2009;80(3):452-9.
48. Coura JR, Suarez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):229-37.
49. Moreira CM, Abo-Shehada M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malaria journal*. 2015;14:360.
50. White NJ, Imwong M. Relapse. *Advances in parasitology*. 2012;80:113-50.
51. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria journal*. 2011;10:297.
52. Marques MM, Costa MR, Santana Filho FS, Vieira JL, Nascimento MT, Brasil LW, et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(1):342-7.
53. de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(7):1125-6.
54. Goncalves LA, Cravo P, Ferreira MU. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):534-9.
55. Saúde Md. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Brasília - DF2010. p. 38.
56. Salinas ND, Tang WK, Tolia NH. Blood-Stage Malaria Parasite Antigens: Structure, Function, and Vaccine Potential. *Journal of molecular biology*. 2019;431(21):4259-80.
57. Kori LD, Valecha N, Anvikar AR. Insights into the early liver stage biology of *Plasmodium*. *Journal of vector borne diseases*. 2018;55(1):9-13.
58. Frischknecht F, Matuschewski K. *Plasmodium* Sporozoite Biology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7(5).
59. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham WH, Duraisingh MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell host & microbe*. 2017;22(2):232-45.
60. Gilson PR, Crabb BS. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *International journal for parasitology*. 2009;39(1):91-6.
61. Matz JM, Beck JR, Blackman MJ. The parasitophorous vacuole of the blood-stage malaria parasite. *Nature reviews Microbiology*. 2020;18(7):379-91.
62. Josling GA, Llinas M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nature reviews Microbiology*. 2015;13(9):573-87.
63. Bannister L, Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends in parasitology*. 2003;19(5):209-13.
64. Figueroa-Villar TCCFMGdSJD. Malaria: historical aspects and chemotherapy. *Química Nova*. 2008;31(5):9.
65. Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Molecular and biochemical parasitology*. 2010;172(2):57-65.
66. Sologub L, Kuehn A, Kern S, Przyborski J, Schillig R, Pradel G. Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito. *Cellular microbiology*. 2011;13(6):897-912.

67. Venugopal K, Hentzschel F, Valkiunas G, Marti M. Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature reviews Microbiology*. 2020;18(3):177-89.
68. Garcia-Basteiro AL, Bassat Q, Alonso PL. Approaching the target: the path towards an effective malaria vaccine. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2012;4(1):e2012015.
69. Chan LJ, Dietrich MH, Nguitragool W, Tham WH. Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. *Cellular microbiology*. 2020;22(1):e13110.
70. Chu CS, White NJ. Management of relapsing Plasmodium vivax malaria. Expert review of anti-infective therapy. 2016;14(10):885-900.
71. Dembele L, Gego A, Zeeman AM, Franetich JF, Silvie O, Rametti A, et al. Towards an in vitro model of Plasmodium hypnozoites suitable for drug discovery. *PloS one*. 2011;6(3):e18162.
72. Shanks GD, White NJ. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *The Lancet Infectious diseases*. 2013;13(10):900-6.
73. Milner DA, Jr. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(1).
74. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN. Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in parasitology*. 2012;80:151-201.
75. Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataide R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. *International journal for parasitology*. 2012;42(12):1099-105.
76. Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in Plasmodium vivax malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Current opinion in infectious diseases*. 2009;22(5):430-5.
77. Adams JH, Mueller I. The Biology of Plasmodium vivax. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7(9).
78. Noviyanti R, Coutrier F, Utami RA, Trimarsanto H, Tirta YK, Trianty L, et al. Contrasting Transmission Dynamics of Co-endemic Plasmodium vivax and P. falciparum: Implications for Malaria Control and Elimination. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(5):e0003739.
79. Campo B, Vandal O, Wesche DL, Burrows JN. Killing the hypnozoite--drug discovery approaches to prevent relapse in Plasmodium vivax. *Pathogens and global health*. 2015;109(3):107-22.
80. Haston JC, Hwang J, Tan KR. Guidance for Using Tafenoquine for Prevention and Antirelapse Therapy for Malaria - United States, 2019. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2019;68(46):1062-8.
81. Frampton JE. Tafenoquine: First Global Approval. *Drugs*. 2018;78(14):1517-23.
82. Júnior JGdS. Tratamento contra malária terá novo medicamento no Brasil <https://portal.fiocruz.br/2019> [cited 2021 11 de Janeiro]. Available from: <https://portal.fiocruz.br/noticia/tratamento-contramalaria-tera-novo-medicamento-no-brasil>.
83. Chu CS, Bancone G, Kelley M, Advani N, Domingo GJ, Cutiongo-de la Paz EM, et al. Optimizing G6PD testing for Plasmodium vivax case management and beyond: why sex, counseling, and community engagement matter. *Wellcome open research*. 2020;5:21.
84. Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. *Advances in parasitology*. 2013;81:133-201.
85. Recht J, Ashley EA, White NJ. Use of primaquine and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency testing: Divergent policies and practices in malaria endemic countries. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(4):e0006230.

86. Vallejo AF, Garcia J, Amado-Garavito AB, Arevalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malaria journal*. 2016;15:48.
87. W.Barnwell MRGEVSMJ. The epidemiology of *Plasmodium vivax* - *Plasmodium vivax*: Modern Strategies to Study a Persistent Parasite's Life Cycle. *Advances in parasitology*. 812013. p. 26.
88. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(2):377-410.
89. Pukrittayakamee S, Imwong M, Singhasivanon P, Stepniewska K, Day NJ, White NJ. Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in *P. vivax* malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;79(3):378-84.
90. Adapa SR, Taylor RA, Wang C, Thomson-Luque R, Johnson LR, Jiang RHY. *Plasmodium vivax* readiness to transmit: implication for malaria eradication. *BMC systems biology*. 2019;13(1):5.
91. Longley RJ, Sattabongkot J, Mueller I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology*. 2016;143(2):154-70.
92. Koepfli C, Colborn KL, Kiniboro B, Lin E, Speed TP, Siba PM, et al. A high force of *Plasmodium vivax* blood-stage infection drives the rapid acquisition of immunity in Papua New Guinean children. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(9):e2403.
93. Lin E, Kiniboro B, Gray L, Dobbie S, Robinson L, Laumaea A, et al. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. *PloS one*. 2010;5(2):e9047.
94. Long CA, Zavala F. *Immune Responses in Malaria*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2017;7(8).
95. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Advances in parasitology*. 2013;81:77-131.
96. Antonelli LR, Junqueira C, Vinetz JM, Golenbock DT, Ferreira MU, Gazzinelli RT. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunological reviews*. 2020;293(1):163-89.
97. Leoratti FM, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PA, Gravina HD, et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(6):e1710.
98. Antonelli LR, Leoratti FM, Costa PA, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, et al. The CD14⁺CD16⁺ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS pathogens*. 2014;10(9):e1004393.
99. Hirako IC, Gallego-Marin C, Ataide MA, Andrade WA, Gravina H, Rocha BC, et al. DNA-Containing Immunocomplexes Promote Inflammasome Assembly and Release of Pyrogenic Cytokines by CD14⁺ CD16⁺ CD64^{high} CD32^{low} Inflammatory Monocytes from Malaria Patients. *mBio*. 2015;6(6):e01605-15.
100. Zhou J, Feng G, Beeson J, Hogarth PM, Rogerson SJ, Yan Y, et al. CD14^(hi)CD16⁺ monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC medicine*. 2015;13:154.
101. Kho S, Minigo G, Andries B, Leonardo L, Prayoga P, Poespoprodjo JR, et al. Circulating Neutrophil Extracellular Traps and Neutrophil Activation Are Increased in Proportion to Disease Severity in Human Malaria. *The Journal of infectious diseases*. 2019;219(12):1994-2004.
102. Rocha BC, Marques PE, Leoratti FMS, Junqueira C, Pereira DB, Antonelli L, et al. Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell reports*. 2015;13(12):2829-41.

103. Wolf AS, Sherratt S, Riley EM. NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. *Frontiers in immunology*. 2017;8:212.
104. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of immunology*. 2002;169(6):2956-63.
105. Ribeiro-Dias F, Tosta CE. Dynamics and kinetics of natural killer cell cytotoxicity in human malaria as evaluated by a novel stepwise cytotoxicity assay. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(4):357-64.
106. Figueiredo MM, Costa PAC, Diniz SQ, Henriques PM, Kano FS, Tada MS, et al. T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. *PLoS pathogens*. 2017;13(7):e1006484.
107. Junqueira C, Barbosa CRR, Costa PAC, Teixeira-Carvalho A, Castro G, Sen Santara S, et al. Cytotoxic CD8(+) T cells recognize and kill *Plasmodium vivax*-infected reticulocytes. *Nature medicine*. 2018;24(9):1330-6.
108. Longley RJ, White MT, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Li Wai Suen CSN, et al. Naturally acquired antibody responses to more than 300 *Plasmodium vivax* proteins in three geographic regions. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(9):e0005888.
109. Tiendrebeogo RW, Adu B, Singh SK, Dziegiel MH, Nebie I, Sirima SB, et al. Antibody-Dependent Cellular Inhibition Is Associated With Reduced Risk Against Febrile Malaria in a Longitudinal Cohort Study Involving Ghanaian Children. *Open forum infectious diseases*. 2015;2(2):ofv044.
110. Jafarshad A, Dziegiel MH, Lundquist R, Nielsen LK, Singh S, Druilhe PL. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγRII and FcγRIII. *Journal of immunology*. 2007;178(5):3099-106.
111. Ortega-Pajares A, Rogerson SJ. The Rough Guide to Monocytes in Malaria Infection. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2888.
112. Douradinha B, Doolan DL. Harnessing immune responses against *Plasmodium* for rational vaccine design. *Trends in parasitology*. 2011;27(6):274-83.
113. Freund J, Thomson KJ, Sommer HE, Walter AW, Schenkein EL. Immunization of Rhesus Monkeys against Malarial Infection (*P. Knowlesi*) with Killed Parasites and Adjuvants. *Science*. 1945;102(2643):202-4.
114. Clyde DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP. Immunization of man against sporozite-induced *falciparum* malaria. *The American journal of the medical sciences*. 1973;266(3):169-77.
115. Vanderberg JP. Reflections on early malaria vaccine studies, the first successful human malaria vaccination, and beyond. *Vaccine*. 2009;27(1):2-9.
116. Chattopadhyay R, Pratt D. Role of controlled human malaria infection (CHMI) in malaria vaccine development: A U.S. food & drug administration (FDA) perspective. *Vaccine*. 2017;35(21):2767-9.
117. Matuschewski K, Borrmann S. Controlled Human Malaria Infection (CHMI) Studies: Over 100 Years of Experience with Parasite Injections. *Methods in molecular biology*. 2019;2013:91-101.
118. Ouattara A, Laurens MB. Vaccines against malaria. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;60(6):930-6.
119. Ballou WR. Malaria vaccines in development. *Expert opinion on emerging drugs*. 2005;10(3):489-503.
120. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. *American journal of preventive medicine*. 2015;49(6 Suppl 4):S319-33.
121. Tables of malaria vaccine projects globally [Internet]. 2017 [cited 19/01/2021]. Available from: https://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/.

122. Menard R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes and infection*. 2000;2(6):633-42.
123. Aliprandini E, Tavares J, Panatieri RH, Thiberge S, Yamamoto MM, Silvie O, et al. Cytotoxic anti-circumsporozoite antibodies target malaria sporozoites in the host skin. *Nature microbiology*. 2018;3(11):1224-33.
124. Cohen J, Nussenzweig V, Nussenzweig R, Vekemans J, Leach A. From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. *Human vaccines*. 2010;6(1):90-6.
125. Kumar KA, Sano G, Boscardin S, Nussenzweig RS, Nussenzweig MC, Zavala F, et al. The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites. *Nature*. 2006;444(7121):937-40.
126. Wilby KJ, Lau TT, Gilchrist SE, Ensom MH. Mosquirix (RTS,S): a novel vaccine for the prevention of *Plasmodium falciparum* malaria. *The Annals of pharmacotherapy*. 2012;46(3):384-93.
127. Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix): an overview. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2020;16(3):480-9.
128. Olotu A, Fegan G, Wambua J, Nyangweso G, Leach A, Lievens M, et al. Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. *The New England journal of medicine*. 2016;374(26):2519-29.
129. Muller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *The EMBO journal*. 1993;12(7):2881-9.
130. Sinnis P, Sim BK. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. *Trends in microbiology*. 1997;5(2):52-8.
131. Matos ADS, Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Baptista BO, de Souza RM, Bitencourt-Chaves L, et al. Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals From the Brazilian Amazon. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2230.
132. Tiono AB, Nebie I, Anagnostou N, Coulibaly AS, Bowyer G, Lam E, et al. First field efficacy trial of the ChAd63 MVA ME-TRAP vectored malaria vaccine candidate in 5-17 months old infants and children. *PloS one*. 2018;13(12):e0208328.
133. Bliss CM, Bowyer G, Anagnostou NA, Havelock T, Snudden CM, Davies H, et al. Assessment of novel vaccination regimens using viral vectored liver stage malaria vaccines encoding ME-TRAP. *Scientific reports*. 2018;8(1):3390.
134. Rampling T, Ewer KJ, Bowyer G, Edwards NJ, Wright D, Sridhar S, et al. Safety and efficacy of novel malaria vaccine regimens of RTS,S/AS01B alone, or with concomitant ChAd63-MVA-vectored vaccines expressing ME-TRAP. *NPJ vaccines*. 2018;3:49.
135. Hodgson SH, Ewer KJ, Bliss CM, Edwards NJ, Rampling T, Anagnostou NA, et al. Evaluation of the efficacy of ChAd63-MVA vectored vaccines expressing circumsporozoite protein and ME-TRAP against controlled human malaria infection in malaria-naive individuals. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(7):1076-86.
136. Espinosa DA, Vega-Rodriguez J, Flores-Garcia Y, Noe AR, Munoz C, Coleman R, et al. The *Plasmodium falciparum* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites as a Candidate for Preerythrocytic and Transmission-Blocking Vaccines. *Infection and immunity*. 2017;85(2).
137. Jimah JR, Salinas ND, Sala-Rabanal M, Jones NG, Sibley LD, Nichols CG, et al. Malaria parasite CelTOS targets the inner leaflet of cell membranes for pore-dependent disruption. *eLife*. 2016;5.
138. Pirahmadi S, Zakeri S, A AM, N DD, Raz AA, J JS, et al. Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) formulated with potent TLR adjuvants induces high-

- affinity antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* infection in *Anopheles stephensi*. *Malaria journal*. 2019;18(1):146.
139. Moreno A, Joyner C. Malaria vaccine clinical trials: what's on the horizon. *Current opinion in immunology*. 2015;35:98-106.
 140. Richard D, MacRaild CA, Riglar DT, Chan JA, Foley M, Baum J, et al. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(19):14815-22.
 141. Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, et al. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitology international*. 2009;58(1):29-35.
 142. Yap A, Azevedo MF, Gilson PR, Weiss GE, O'Neill MT, Wilson DW, et al. Conditional expression of apical membrane antigen 1 in *Plasmodium falciparum* shows it is required for erythrocyte invasion by merozoites. *Cellular microbiology*. 2014;16(5):642-56.
 143. Yang ASP, Lopaticki S, O'Neill MT, Erickson SM, Douglas DN, Kneteman NM, et al. AMA1 and MAEBL are important for *Plasmodium falciparum* sporozoite infection of the liver. *Cellular microbiology*. 2017;19(9).
 144. Tables of malaria vaccine projects globally [Internet]. 2017. Available from: https://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/.
 145. Sheehy SH, Duncan CJ, Elias SC, Biswas S, Collins KA, O'Hara GA, et al. Phase Ia clinical evaluation of the safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen AMA1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors. *PloS one*. 2012;7(2):e31208.
 146. Rodriguez M, Lustigman S, Montero E, Oksov Y, Lobo CA. PfRH5: a novel reticulocyte-binding family homolog of *Plasmodium falciparum* that binds to the erythrocyte, and an investigation of its receptor. *PloS one*. 2008;3(10):e3300.
 147. Baum J, Chen L, Healer J, Lopaticki S, Boyle M, Triglia T, et al. Reticulocyte-binding protein homologue 5 - an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *International journal for parasitology*. 2009;39(3):371-80.
 148. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2011;480(7378):534-7.
 149. Rodriguez LE, Curtidor H, Ocampo M, Garcia J, Puentes A, Valbuena J, et al. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2005;14(7):1778-86.
 150. Salamanca DR, Gomez M, Camargo A, Cuy-Chaparro L, Molina-Franky J, Reyes C, et al. *Plasmodium falciparum* Blood Stage Antimalarial Vaccines: An Analysis of Ongoing Clinical Trials and New Perspectives Related to Synthetic Vaccines. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2712.
 151. Miura K. Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines. *Expert review of vaccines*. 2016;15(6):765-81.
 152. Pattaradilokrat S, Trakoolsoontorn C, Simpalipan P, Warrit N, Kaewthamasorn M, Harnyuttanakorn P. Size and sequence polymorphisms in the glutamate-rich protein gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in Thailand. *Parasites & vectors*. 2018;11(1):49.
 153. Paul G, Deshmukh A, Kaur I, Rathore S, Dabral S, Panda A, et al. A novel Pfs38 protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* blood-stage merozoites. *Malaria journal*. 2017;16(1):79.
 154. Stallmach R, Kavishwar M, Withers-Martinez C, Hackett F, Collins CR, Howell SA, et al. *Plasmodium falciparum* SERA5 plays a non-enzymatic role in the malarial asexual blood-stage lifecycle. *Molecular microbiology*. 2015;96(2):368-87.

155. Collins CR, Hackett F, Atid J, Tan MSY, Blackman MJ. The Plasmodium falciparum pseudoprotease SERA5 regulates the kinetics and efficiency of malaria parasite egress from host erythrocytes. *PLoS pathogens*. 2017;13(7):e1006453.
156. Yagi M, Bang G, Tougan T, Palacpac NM, Arisue N, Aoshi T, et al. Protective epitopes of the Plasmodium falciparum SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences. *PloS one*. 2014;9(6):e98460.
157. Olugbile S, Kulangara C, Bang G, Bertholet S, Suzarte E, Villard V, et al. Vaccine potentials of an intrinsically unstructured fragment derived from the blood stage-associated Plasmodium falciparum protein PFF0165c. *Infection and immunity*. 2009;77(12):5701-9.
158. Steiner-Monard V, Kamaka K, Karoui O, Roethlisberger S, Audran R, Daubenberger C, et al. The Candidate Blood-stage Malaria Vaccine P27A Induces a Robust Humoral Response in a Fast Track to the Field Phase 1 Trial in Exposed and Nonexposed Volunteers. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2019;68(3):466-74.
159. Geiger KM, Guignard D, Yang C, Bikorimana JP, Correia BE, Houard S, et al. Epitope Mapping and Fine Specificity of Human T and B Cell Responses for Novel Candidate Blood-Stage Malaria Vaccine P27A. *Frontiers in immunology*. 2020;11:412.
160. Patra KP, Li F, Carter D, Gregory JA, Baga S, Reed SG, et al. Alga-produced malaria transmission-blocking vaccine candidate Pfs25 formulated with a human use-compatible potent adjuvant induces high-affinity antibodies that block Plasmodium falciparum infection of mosquitoes. *Infection and immunity*. 2015;83(5):1799-808.
161. Miura K, Takashima E, Deng B, Tullo G, Diouf A, Moretz SE, et al. Functional comparison of Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay. *Infection and immunity*. 2013;81(12):4377-82.
162. Chaves LB, Perce-da-Silva DS, Totino PRR, Riccio EKP, Baptista BO, de Souza ABL, et al. Plasmodium vivax ookinete surface protein (Pvs25) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2019;73:287-94.
163. Arevalo-Herrera M, Solarte Y, Marin C, Santos M, Castellanos J, Beier JC, et al. Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106 Suppl 1:202-11.
164. Shimp RL, Jr., Rowe C, Reiter K, Chen B, Nguyen V, Aebig J, et al. Development of a Pfs25-EPA malaria transmission blocking vaccine as a chemically conjugated nanoparticle. *Vaccine*. 2013;31(28):2954-62.
165. Chichester JA, Green BJ, Jones RM, Shoji Y, Miura K, Long CA, et al. Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine*. 2018;36(39):5865-71.
166. Theisen M, Jore MM, Sauerwein R. Towards clinical development of a Pfs48/45-based transmission blocking malaria vaccine. *Expert review of vaccines*. 2017;16(4):329-36.
167. van Dijk MR, Janse CJ, Thompson J, Waters AP, Braks JA, Dodemont HJ, et al. A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell*. 2001;104(1):153-64.
168. Ishino T, Tsuboi T. Progress toward a transmission-blocking vaccine against malaria. *The Lancet Infectious diseases*. 2018;18(9):927-8.
169. Cao Y, Bansal GP, Merino K, Kumar N. Immunological Cross-Reactivity between Malaria Vaccine Target Antigen P48/45 in Plasmodium vivax and P. falciparum and Cross-Boosting of Immune Responses. *PloS one*. 2016;11(7):e0158212.
170. Cao Y, Hart RJ, Bansal GP, Kumar N. Functional Conservation of P48/45 Proteins in the Transmission Stages of Plasmodium vivax (Human Malaria Parasite) and P. berghei (Murine Malaria Parasite). *mBio*. 2018;9(5).

171. Tentokam BCN, Amaratunga C, Alani NAH, MacDonald NJ, Narum DL, Salinas ND, et al. Naturally Acquired Antibody Response to Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidate Pvs230 Domain 1. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2295.
172. Marin-Mogollon C, van de Vegte-Bolmer M, van Gemert GJ, van Pul FJA, Ramesar J, Othman AS, et al. The *Plasmodium falciparum* male gametocyte protein P230p, a paralog of P230, is vital for ookinete formation and mosquito transmission. *Scientific reports*. 2018;8(1):14902.
173. van Dijk MR, van Schaijk BC, Khan SM, van Dooren MW, Ramesar J, Kaczanowski S, et al. Three members of the 6-cys protein family of *Plasmodium* play a role in gamete fertility. *PLoS pathogens*. 2010;6(4):e1000853.
174. Singh K, Burkhardt M, Nakuchima S, Herrera R, Muratova O, Gittis AG, et al. Structure and function of a malaria transmission blocking vaccine targeting Pfs230 and Pfs230-Pfs48/45 proteins. *Communications biology*. 2020;3(1):395.
175. Payne RO, Silk SE, Elias SC, Milne KH, Rawlinson TA, Llewellyn D, et al. Human vaccination against *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. *JCI insight*. 2017;2(12).
176. de Cassan SC, Shakri AR, Llewellyn D, Elias SC, Cho JS, Goodman AL, et al. Preclinical Assessment of Viral Vectored and Protein Vaccines Targeting the Duffy-Binding Protein Region II of *Plasmodium Vivax*. *Frontiers in immunology*. 2015;6:348.
177. Chitnis CE, Sharma A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends in parasitology*. 2008;24(1):29-34.
178. Moreno A, Caro-Aguilar I, Yazdani SS, Shakri AR, Lapp S, Strobert E, et al. Preclinical assessment of the receptor-binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein as a vaccine candidate in rhesus macaques. *Vaccine*. 2008;26(34):4338-44.
179. Atcheson E, Reyes-Sandoval A. Protective efficacy of peptides from *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Vaccine*. 2020;38(27):4346-54.
180. Jordan-Villegas A, Perdomo AB, Epstein JE, Lopez J, Castellanos A, Manzano MR, et al. Immune responses and protection of Aotus monkeys immunized with irradiated *Plasmodium vivax* sporozoites. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(2 Suppl):43-50.
181. Arevalo-Herrera M, Lopez-Perez M, Dotsey E, Jain A, Rubiano K, Felgner PL, et al. Antibody Profiling in Naive and Semi-immune Individuals Experimentally Challenged with *Plasmodium vivax* Sporozoites. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3):e0004563.
182. Arevalo-Herrera M, Vasquez-Jimenez JM, Lopez-Perez M, Vallejo AF, Amado-Garavito AB, Cespedes N, et al. Protective Efficacy of *Plasmodium vivax* Radiation-Attenuated Sporozoites in Colombian Volunteers: A Randomized Controlled Trial. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(10):e0005070.
183. Tham WH, Beeson JG, Rayner JC. *Plasmodium vivax* vaccine research - we've only just begun. *International journal for parasitology*. 2017;47(2-3):111-8.
184. Favuzza P, Guffart E, Tamborrini M, Scherer B, Dreyer AM, Rufer AC, et al. Structure of the malaria vaccine candidate antigen CyRPA and its complex with a parasite invasion inhibitory antibody. *eLife*. 2017;6.
185. Volz JC, Yap A, Sisquella X, Thompson JK, Lim NT, Whitehead LW, et al. Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *Cell host & microbe*. 2016;20(1):60-71.
186. Healer J, Wong W, Thompson JK, He W, Birkinshaw RW, Miura K, et al. Neutralising antibodies block the function of Rh5/Ripr/CyRPA complex during invasion of *Plasmodium falciparum* into human erythrocytes. *Cellular microbiology*. 2019;21(7):e13030.
187. Dreyer AM, Matile H, Papastogiannidis P, Kamber J, Favuzza P, Voss TS, et al. Passive immunoprotection of *Plasmodium falciparum*-infected mice designates the CyRPA as candidate malaria vaccine antigen. *Journal of immunology*. 2012;188(12):6225-37.

188. Favuzza P, Blaser S, Dreyer AM, Riccio G, Tamborrini M, Thoma R, et al. Generation of Plasmodium falciparum parasite-inhibitory antibodies by immunization with recombinantly-expressed CyRPA. *Malaria journal*. 2016;15:161.
189. Knuepfer E, Wright KE, Kumar Prajapati S, Rawlinson TA, Mohring F, Koch M, et al. Divergent roles for the RH5 complex components, CyRPA and RIPR in human-infective malaria parasites. *PLoS pathogens*. 2019;15(6):e1007809.
190. Franca CT, White MT, He WQ, Hostetler JB, Brewster J, Frato G, et al. Identification of highly-protective combinations of Plasmodium vivax recombinant proteins for vaccine development. *eLife*. 2017;6.
191. Rappuoli R, Bottomley MJ, D'Oro U, Finco O, De Gregorio E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *The Journal of experimental medicine*. 2016;213(4):469-81.
192. Mora M, Veggi D, Santini L, Pizza M, Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Drug discovery today*. 2003;8(10):459-64.
193. Moxon R, Reche PA, Rappuoli R. Editorial: Reverse Vaccinology. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2776.
194. Udomsangpetch R, Kaneko O, Chotivanich K, Sattabongkot J. Cultivation of Plasmodium vivax. *Trends in parasitology*. 2008;24(2):85-8.
195. Masignani V, Pizza M, Moxon ER. The Development of a Vaccine Against Meningococcus B Using Reverse Vaccinology. *Frontiers in immunology*. 2019;10:751.
196. Pritam M, Singh G, Swaroop S, Singh AK, Singh SP. Exploitation of reverse vaccinology and immunoinformatics as promising platform for genome-wide screening of new effective vaccine candidates against Plasmodium falciparum. *BMC bioinformatics*. 2019;19(Suppl 13):468.
197. Sanasam BD, Kumar S. In-silico structural modeling and epitope prediction of highly conserved Plasmodium falciparum protein AMR1. *Molecular immunology*. 2019;116:131-9.
198. Singh SP, Srivastava D, Mishra BN. Genome-wide identification of novel vaccine candidates for Plasmodium falciparum malaria using integrative bioinformatics approaches. *3 Biotech*. 2017;7(5):318.
199. Sedegah M, Kim Y, Peters B, McGrath S, Ganeshan H, Lejano J, et al. Identification and localization of minimal MHC-restricted CD8+ T cell epitopes within the Plasmodium falciparum AMA1 protein. *Malaria journal*. 2010;9:241.
200. Kusi KA, Aggor FE, Amoah LE, Anum D, Nartey Y, Amoako-Sakyi D, et al. Identification of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-specific CD8+ T cell epitopes in a malaria exposed population. *PloS one*. 2020;15(2):e0228177.
201. Aza-Conde J, Reyes C, Suarez CF, Patarroyo MA, Patarroyo ME. The molecular basis for peptide-based antimalarial vaccine development targeting erythrocyte invasion by P. falciparum. *Biochemical and biophysical research communications*. 2021;534:86-93.
202. Rodrigues-da-Silva RN, Martins da Silva JH, Singh B, Jiang J, Meyer EV, Santos F, et al. In silico Identification and Validation of a Linear and Naturally Immunogenic B-Cell Epitope of the Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate Merozoite Surface Protein-9. *PloS one*. 2016;11(1):e0146951.
203. Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Lopez-Camacho C, Martins da Silva JH, Perce-da-Silva DS, Teva A, et al. Plasmodium vivax Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites: Naturally Acquired Humoral Immune Response and B-Cell Epitope Mapping in Brazilian Amazon Inhabitants. *Frontiers in immunology*. 2017;8:77.
204. Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *Journal of biomedical informatics*. 2015;53:405-14.
205. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical parasitology*. 1993;61(2):315-20.

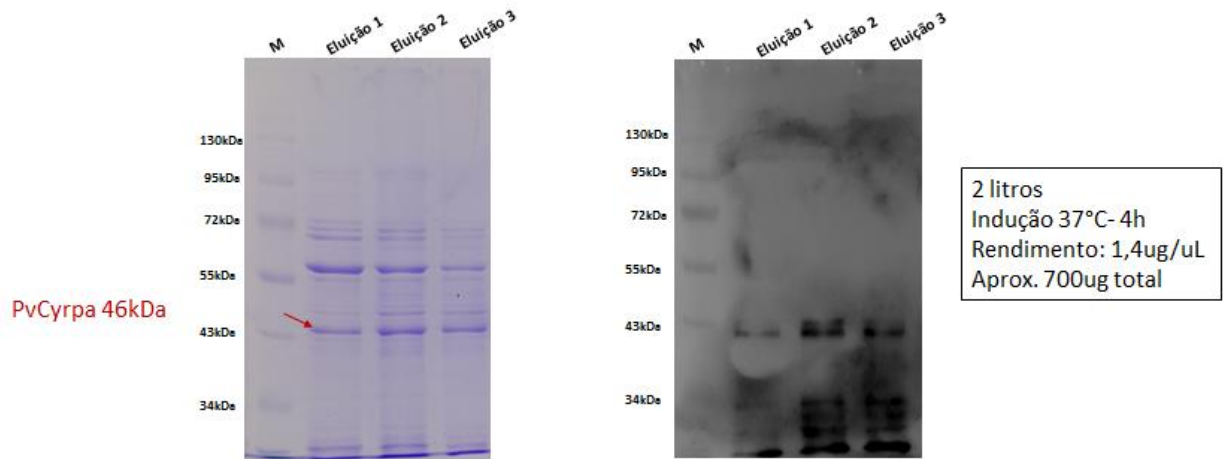
206. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*. 2006;2:2.
207. Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, Tamang D, Wang P, Greenbaum J, et al. Immune epitope database analysis resource. *Nucleic acids research*. 2012;40(Web Server issue):W525-30.
208. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2003;12(5):1007-17.
209. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic acids research*. 2008;36(Web Server issue):W509-12.
210. Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC bioinformatics*. 2005;6:132.
211. Sidney J, Assarsson E, Moore C, Ngo S, Pinilla C, Sette A, et al. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome research*. 2008;4:2.
212. Frank R. The SPOT-synthesis technique. *Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications*. *J Immunol Methods*. 2002;267(1):13-26.
213. Partey FD, Castberg FC, Sarbah EW, Silk SE, Awandare GA, Draper SJ, et al. Kinetics of antibody responses to PfRH5-complex antigens in Ghanaian children with *Plasmodium falciparum* malaria. *PloS one*. 2018;13(6):e0198371.
214. Boyle MJ, Chan JA, Handayuni I, Reiling L, Feng G, Hilton A, et al. IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Science advances*. 2019;5(9):eaax4489.
215. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. *Folia biologica*. 2000;46(6):210-8.
216. Elliott SR, Brennan AK, Beeson JG, Tadesse E, Molyneux ME, Brown GV, et al. Placental malaria induces variant-specific antibodies of the cytophilic subtypes immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 that correlate with adhesion inhibitory activity. *Infection and immunity*. 2005;73(9):5903-7.
217. Lusingu JP, Vestergaard LS, Alifrangis M, Mmbando BP, Theisen M, Kitua AY, et al. Cytophilic antibodies to *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein are associated with malaria protection in an area of holoendemic transmission. *Malaria journal*. 2005;4:48.
218. Kana IH, Garcia-Senosian A, Singh SK, Tiendrebeogo RW, Chourasia BK, Malhotra P, et al. Cytophilic Antibodies Against Key *Plasmodium falciparum* Blood Stage Antigens Contribute to Protection Against Clinical Malaria in a High Transmission Region of Eastern India. *The Journal of infectious diseases*. 2018;218(6):956-65.
219. Adamou R, Dechavanne C, Sadissou I, d'Almeida T, Bouraima A, Sonon P, et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-specific cytophilic IgG and control of malaria infection in a Beninese birth cohort. *Malaria journal*. 2019;18(1):194.
220. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):13-36, Table of Contents.
221. Dobbs KR, Dent AE. *Plasmodium* malaria and antimalarial antibodies in the first year of life. *Parasitology*. 2016;143(2):129-38.
222. Cockburn IA, Seder RA. Malaria prevention: from immunological concepts to effective vaccines and protective antibodies. *Nature immunology*. 2018;19(11):1199-211.
223. Hutchings CL, Birkett AJ, Moore AC, Hill AV. Combination of protein and viral vaccines induces potent cellular and humoral immune responses and enhanced protection from murine malaria challenge. *Infection and immunity*. 2007;75(12):5819-26.
224. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Fernandez OL, Victoria L, Lenis AM, et al. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;73(5 Suppl):3-9.

225. Moormann AM, Sumba PO, Chelimo K, Fang H, Tisch DJ, Dent AE, et al. Humoral and cellular immunity to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and protection from infection with blood-stage parasites. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(1):149-58.
226. Almeida AP, Dias MO, Vieira Cde A, Chavez-Olortegui C, Gazzineli RT, Rodrigues MM, et al. Long-lasting humoral and cellular immune responses elicited by immunization with recombinant chimeras of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Vaccine*. 2014;32(19):2181-7.

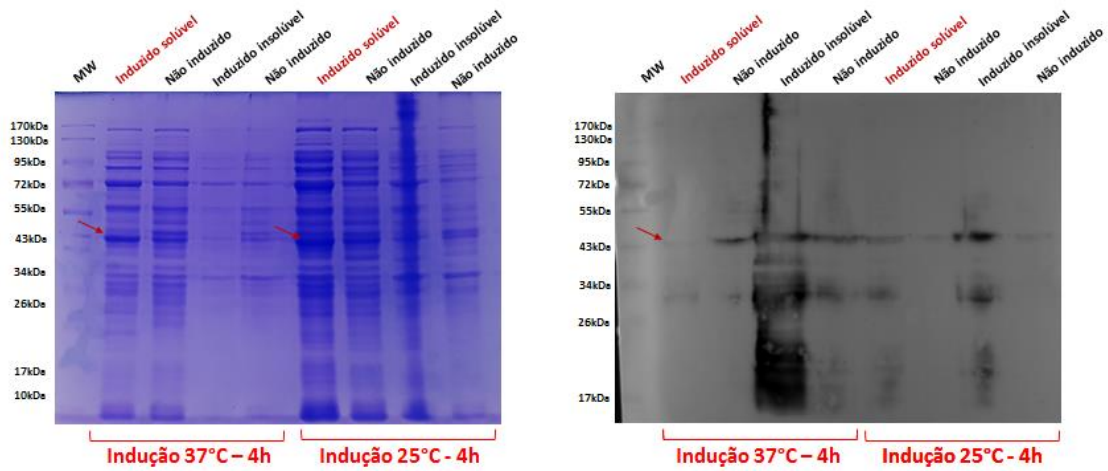
10 ANEXOS

Anexo I – Resultados da expressão da proteína recombinante PvCyrPA

Teste expressão PvCyrpa em *E. coli* BL21 STAR
-Purificação com níquel-

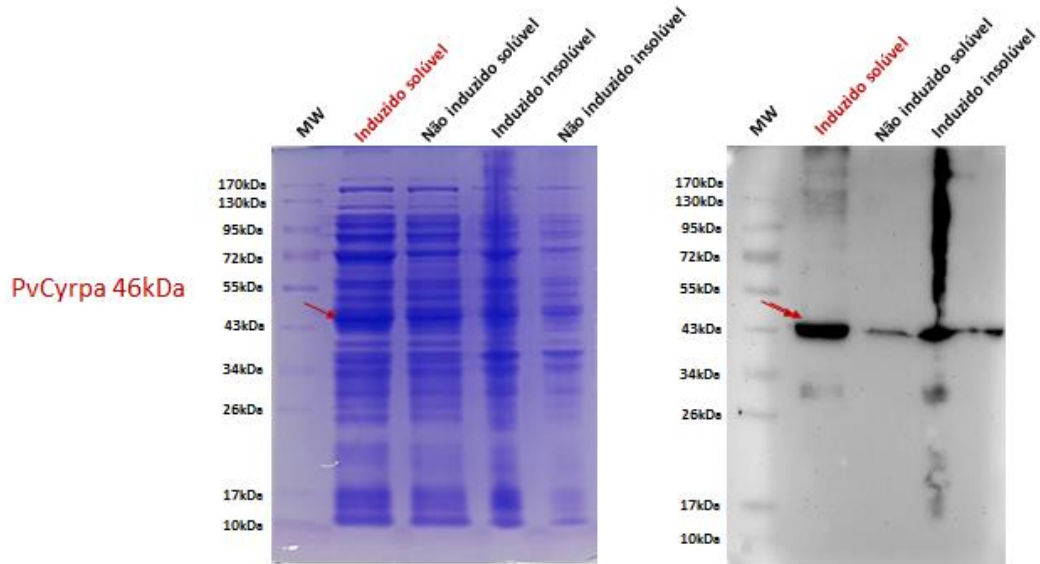


Teste expressão *E. coli* BL21 STAR
Diferentes temperaturas e tempo de indução



Teste expressão E. coli BL21 STAR
Diferentes temperaturas e tempo de indução

Indução 15°C- overnight



Anexo II – Resultados de HPLC dos peptídeos sintéticos (WatsonBio)

HPLC Report

Structure: EK-15

Sequence: [H]-ECYLYYTEQNAIIVVK-[OH]

Order ID/Name: 104321-1/Item-1

Lot No.: WB176872-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ Solvent A: 0.1%

trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:** A B

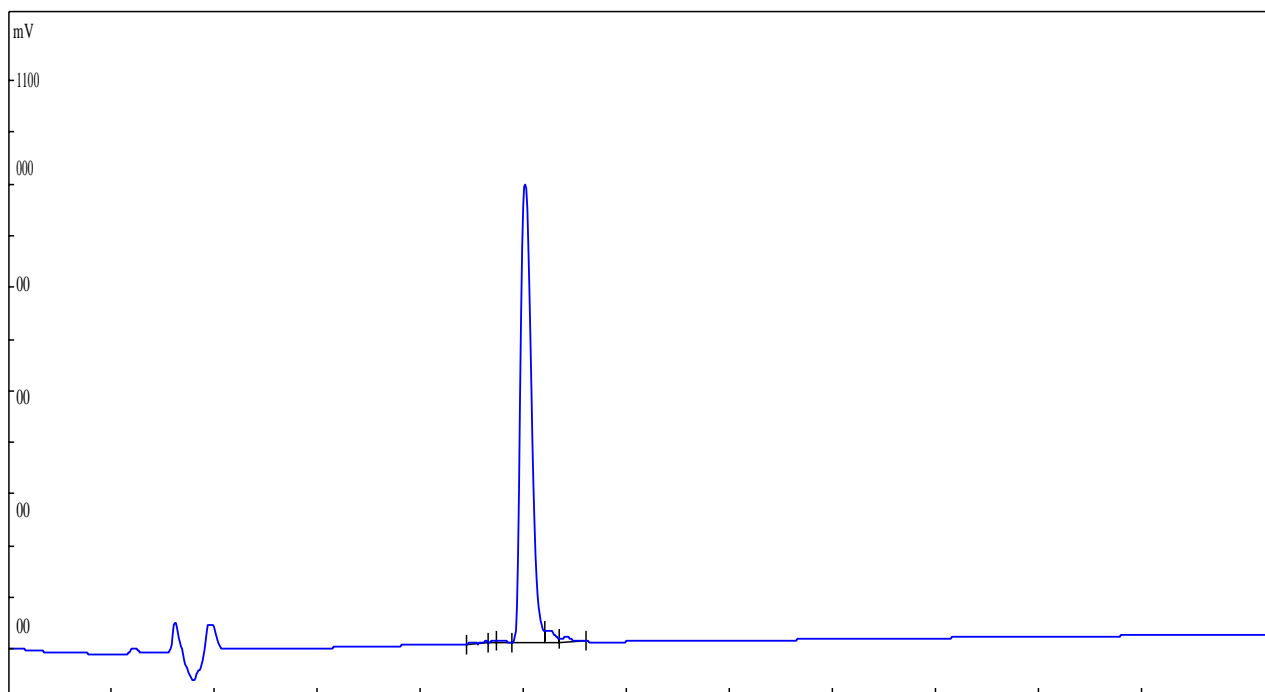
0.01min 82% 18%

25min 57% 43%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	9.249	3601	28119	0.2233
2	9.416	5297	40885	0.3247
3	9.565	5960	66170	0.5255
4	10.009	886228	12053730	95.73
5	10.468	23570	282588	2.244
6	10.806	10213	120449	0.9565
Total				100.0000

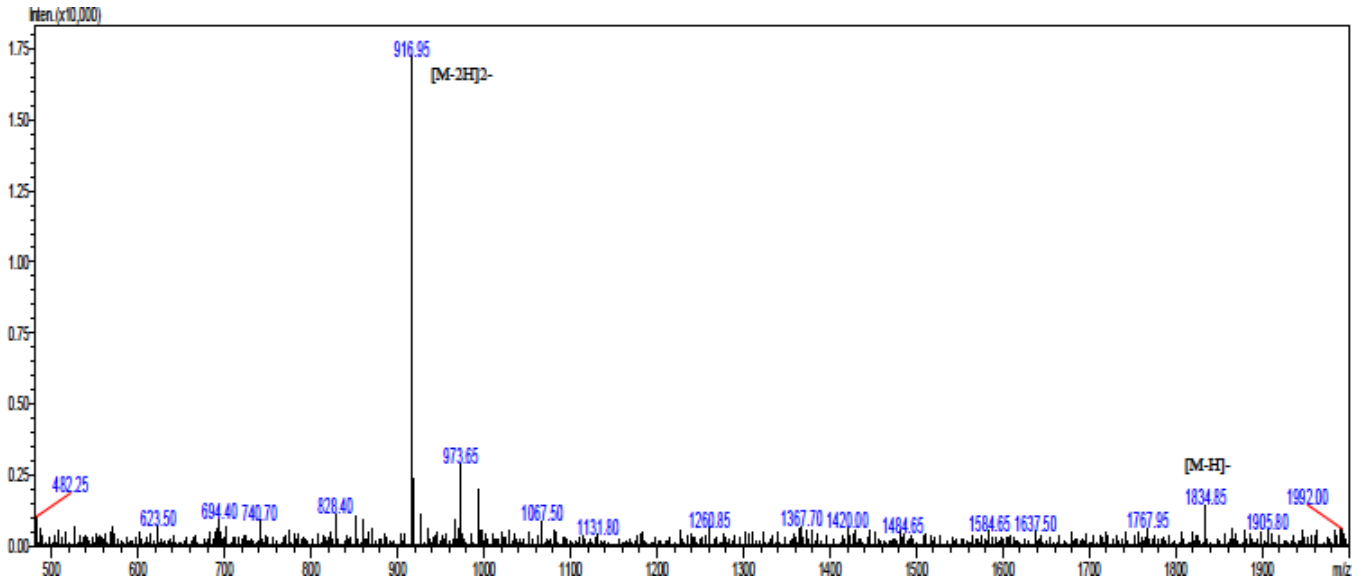
Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-1
Sequence: [H]-ECYLYYTEQNAIIVVK-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019
Acquired by: SHAO
Injection Volume: 1
Sample Name: 104321-1
MW: 1836.1
Lot No.: WB176872-P190124

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV
Detector: 1.5 kV
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50% H₂O/50% ACN



HPLC Report

Structure: SI-15

Sequence: [H]-SVFNFIHNDEIIIVI-[OH]

Order ID/Name: 104321-2/Item-2

Lot No.: WB176873-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:** A B

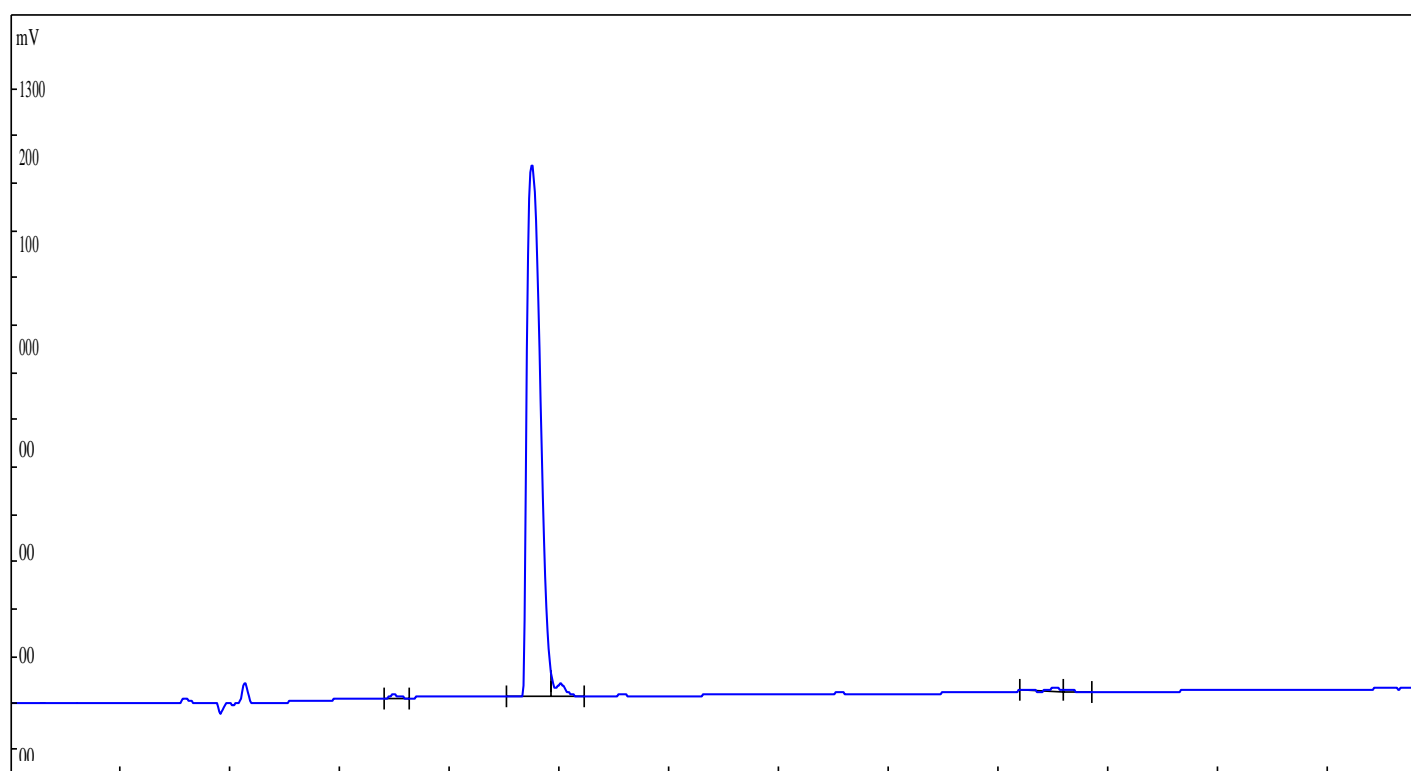
0.01min 85% 15%

25min 60% 40%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	6.958	6937	65083	0.3601
2	9.479	1120992	17518294	96.91
3	9.998	24713	357017	1.975
4	19.007	7973	93024	0.5146
5	19.246	5018	42641	0.2359
Total				100.0000

Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-2
Sequence: [H]-SVFNFIHNDEIIIVI-[OH]

Data Acquired: 2/23/2019

Acquired by: YU

Injection Volume: 1

Sample Name: 104321-2

MW: 1773.08

Lot No.: WB176873-P190124

Probe: ESI

Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min

CDL: -20.0 V

CDL Temp: 250 °C

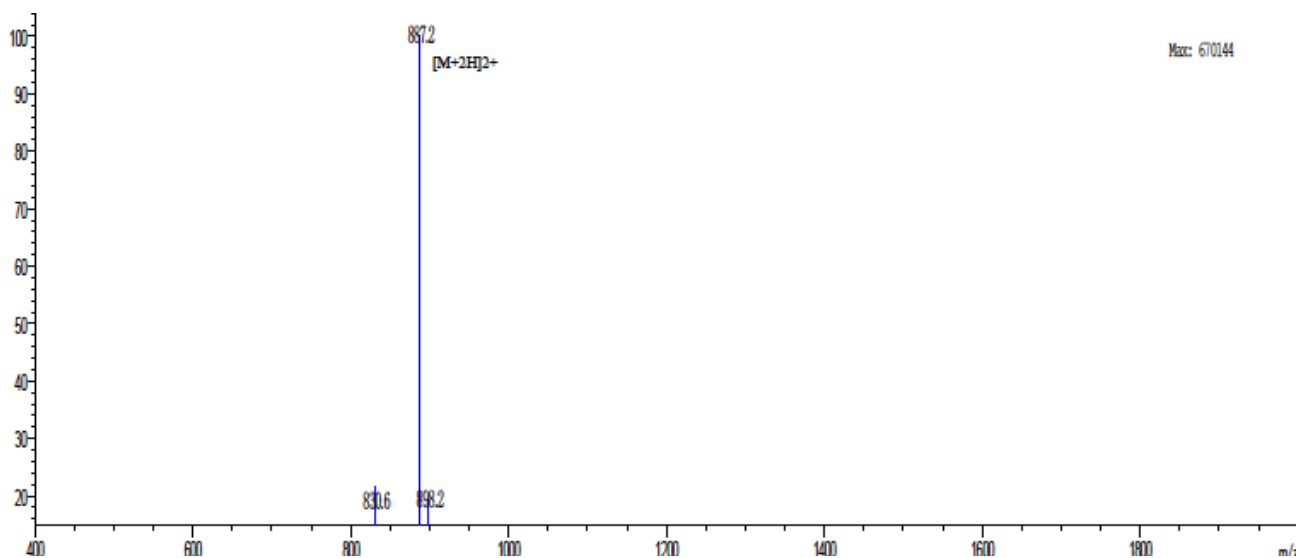
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV

Detector: 1.5 kV

T.Flow: 0.2 mL/min

B.conc: 50% H₂O/50% ACN



HPLC Report

Structure: DI-15

Sequence: [H]-DIYFLFRNELYKTCI-[OH]

Order ID/Name: 104321-3/Item-3

Lot No.: WB176874-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:**

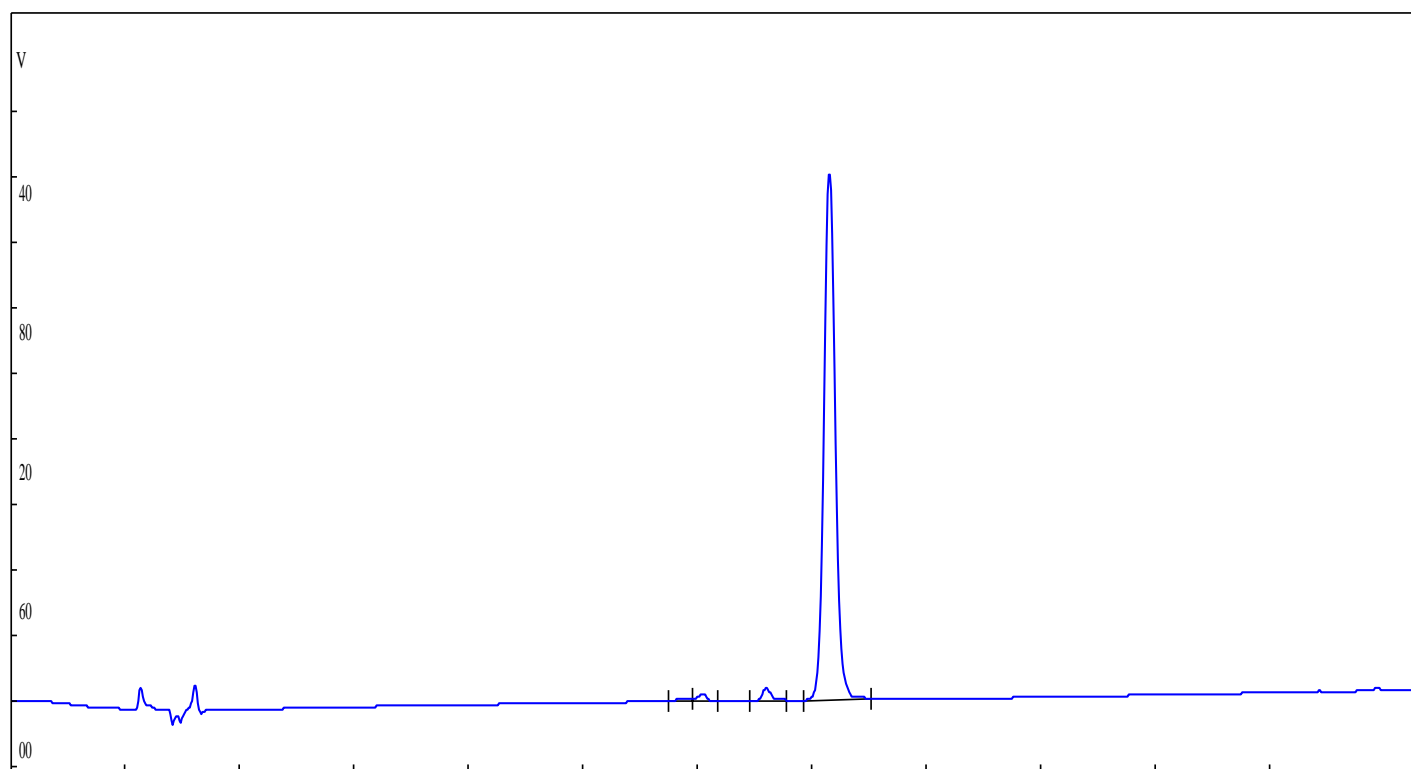
0.01min 72% 28%

25min 47% 53%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl

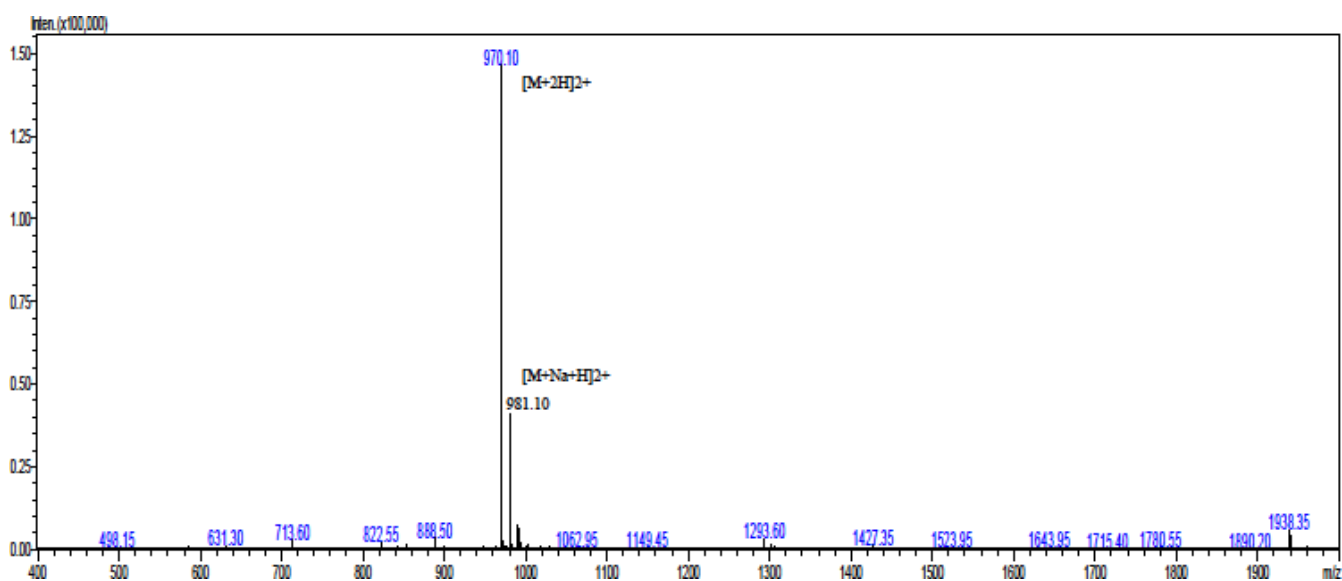


Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	11.698	3749	62004	0.9837
2	12.073	7087	87802	1.393
3	13.178	11299	115894	1.839
4	14.282	479680	6037962	95.78
Total				100.0000

Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-3
Sequence: [H]-DIYFLFRNELYKTCI-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019	Probe: ESI	Probe bias: 4.5 kV
Acquired by: SHAO	Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min	Detector: 1.5 kV
Injection Volume: 1	CDL: -20.0 V	T.Flow: 0.2 mL/min
Sample Name: 104321-3	CDL Temp: 250 °C	B.conc: 50% H ₂ O/50% ACN
MW: 1938.29	Block Temp: 200 °C	
Lot No.: WB176874-P190124		



HPLC Report

Structure: LF-15

Sequence: [H]-LQKGVVPYFYLRPIIF-[OH]

Order ID/Name: 104321-4/Item-4

Lot No.: WB176875-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:**

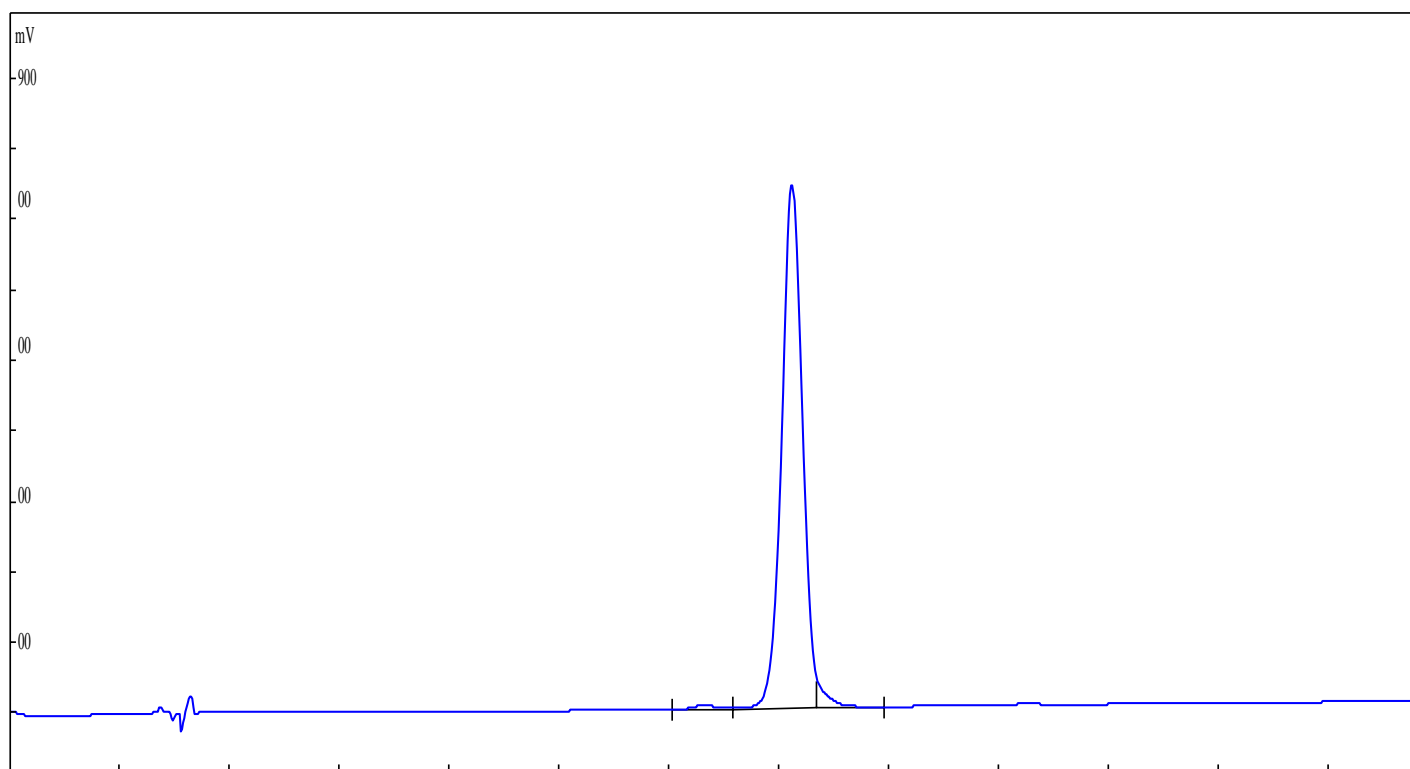
0.01min 72% 28%

25min 47% 53%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	12.642	5669	159612	0.8337
2	14.213	741154	18522805	96.75
3	14.673	36866	462278	2.415
Total				100.0000

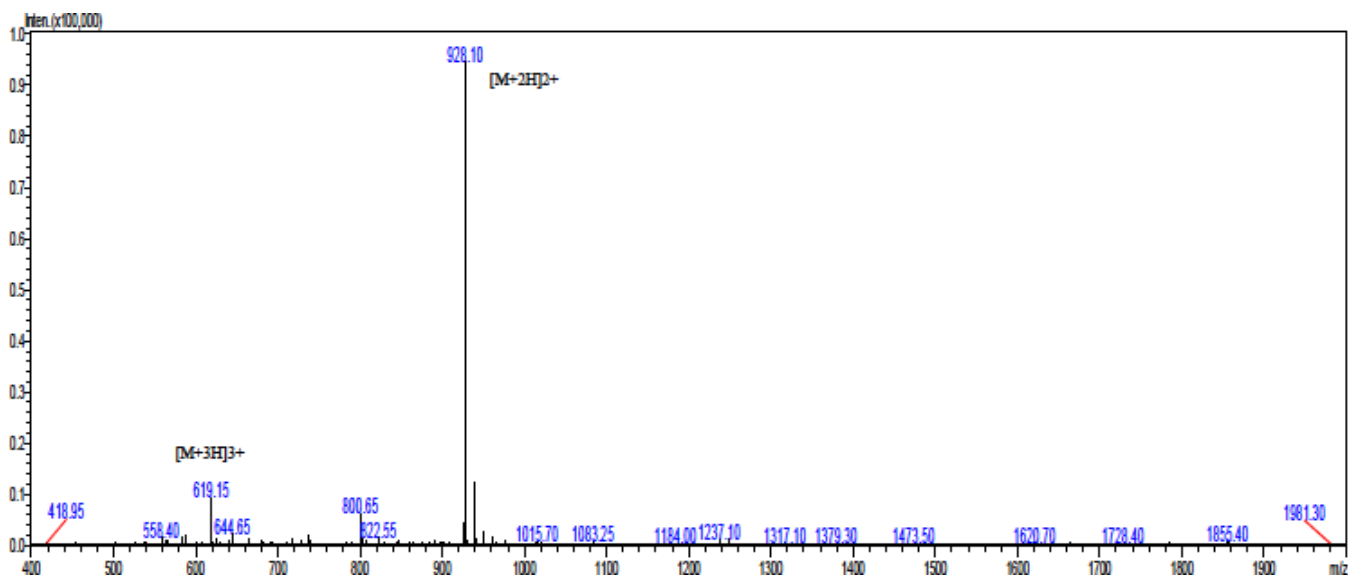
Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-4
Sequence: [H]-LQKGVPPYFYLRPIIF-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019
Acquired by: SHAO
Injection Volume: 1
Sample Name: 104321-4
MW: 1854.29
Lot No.: WB176875-P190124

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV
Detector: 1.5 kV
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50% H₂O/50% ACN



HPLC Report

Structure: TS-15

Sequence: [H]-TVKKNKKFLLICGILS-[OH]

Order ID/Name: 104321-5/Item-5

Lot No.: WB176876-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:**

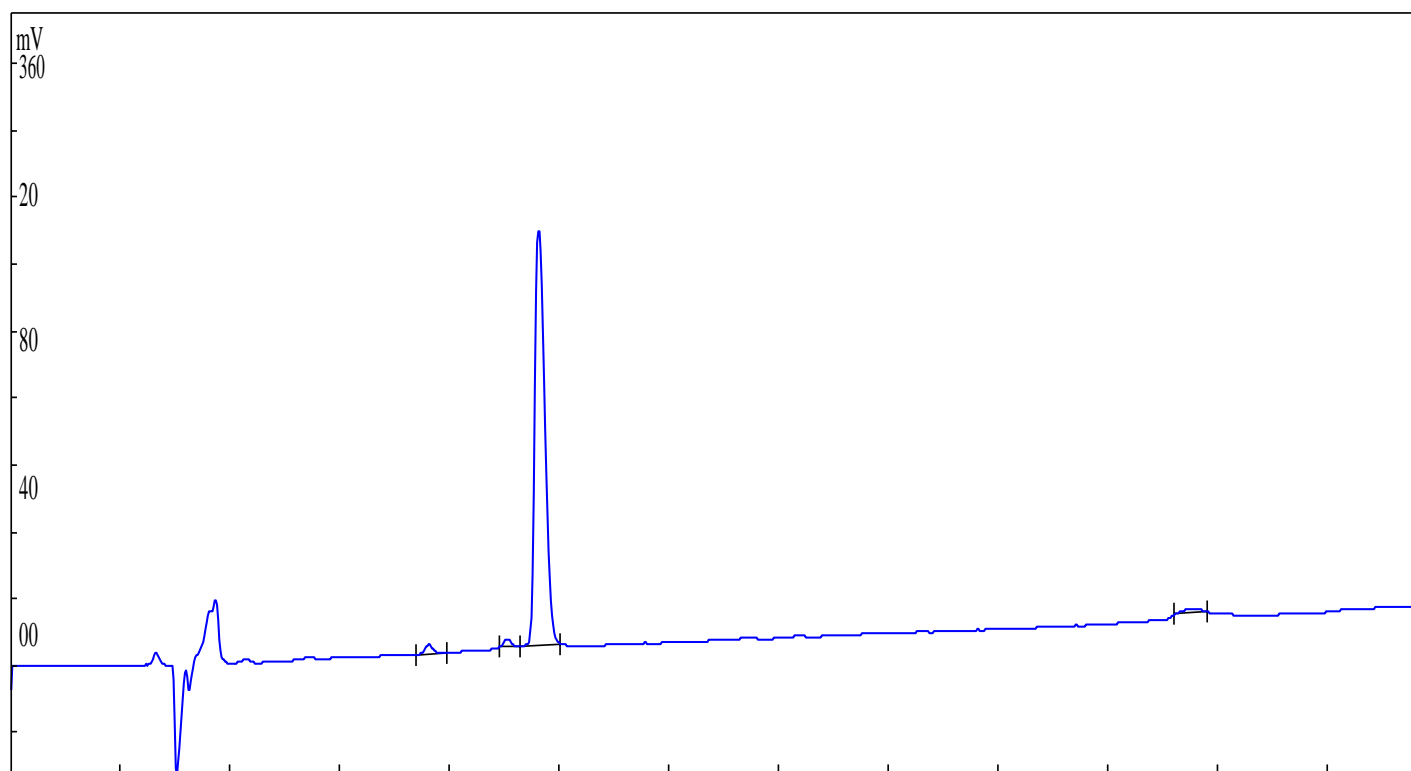
0.01min 75% 25%

25min 50% 50%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	7.597	5226	43405	1.441
2	9.028	4593	38071	1.264
3	9.601	247311	2872115	95.34
4	21.482	2637	58756	1.951
Total				100.0000

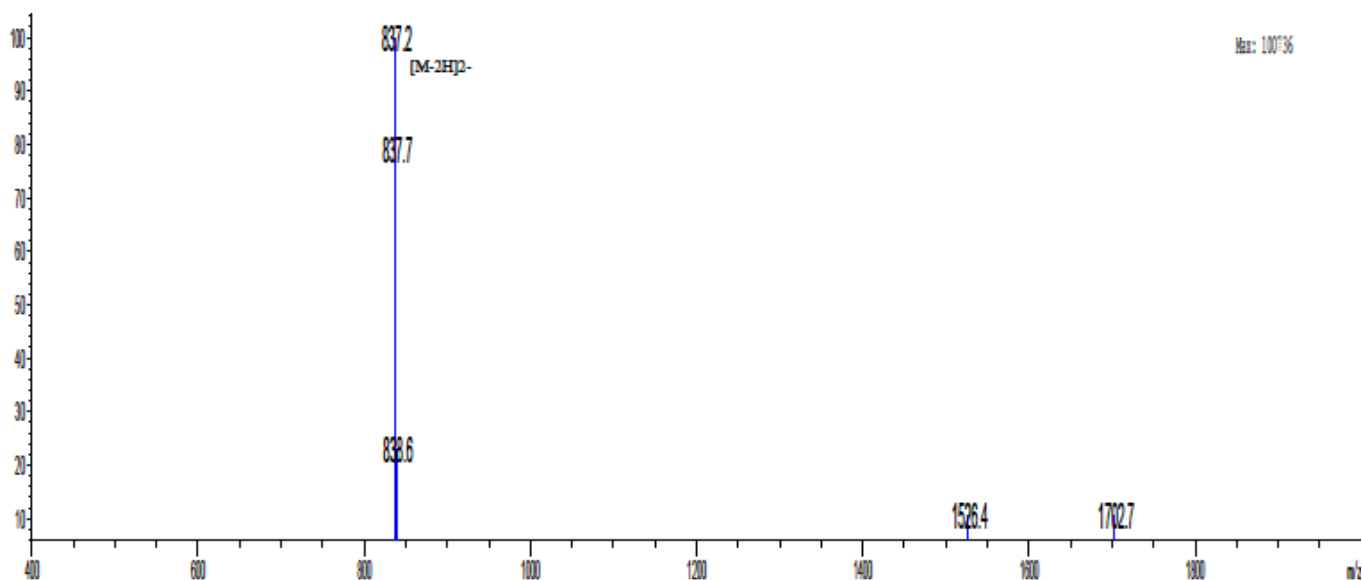
Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-5
Sequence: [H]-TVKNKKFLLICGILS-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019
Acquired by: YU
Injection Volume: 1
Sample Name: 104321-5
MW: 1677.13
Lot No.: WB176876-P190124

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV
Detector: 1.5 kV
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50% H₂O/50% ACN



HPLC Report

Structure: PG-15

Sequence: [H]-PYFYLRPIIFGDEFG-[OH]

Order ID/Name: 104321-6/Item-6

Lot No.: WB176877-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:**

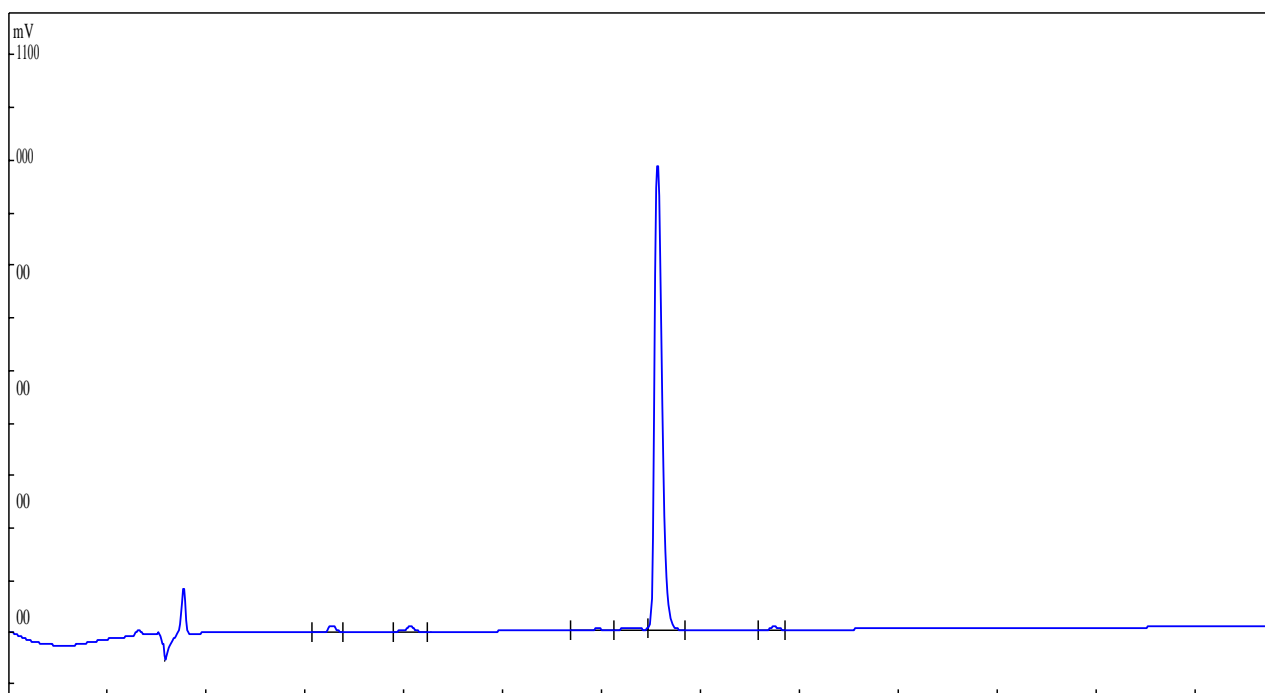
0.01min 70% 30%

25min 45% 55%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	6.518	12471	122451	1.402
2	8.103	10595	114487	1.311
3	11.898	4244	49731	0.5694
4	12.924	4346	89509	1.025
5	13.103	883811	8322575	95.28
6	15.457	4902	35866	0.4106
Total				100.0000

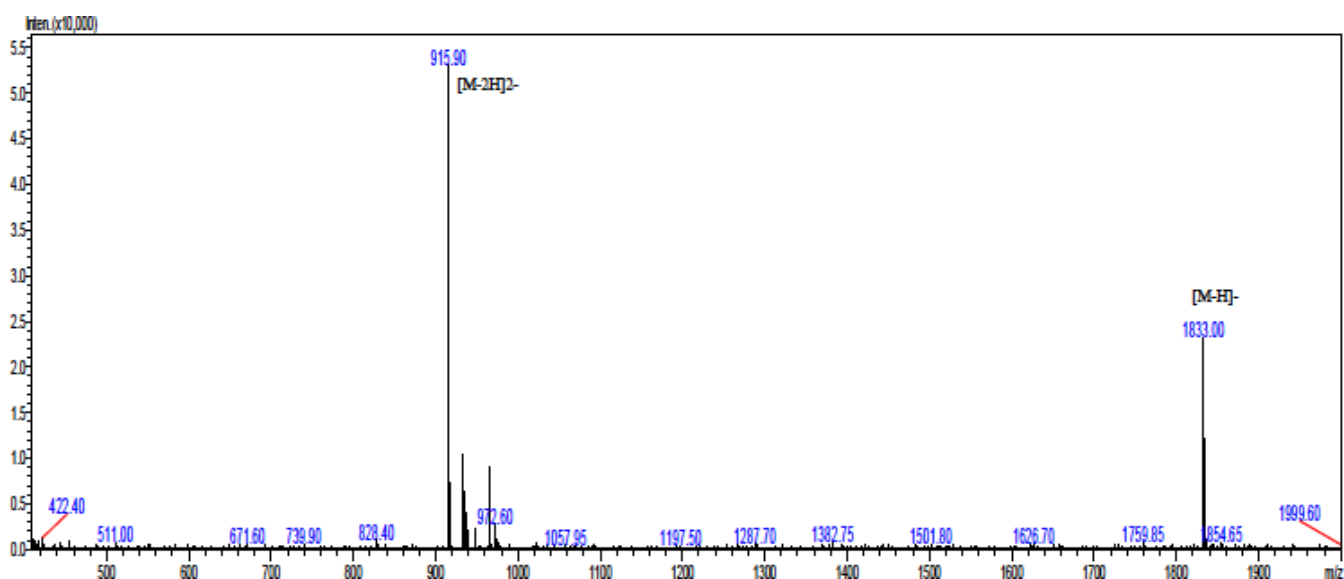
Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-6
Sequence: [H]-PYFYLRPIIFGDEFG-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019
Acquired by: SHAO
Injection Volume: 1
Sample Name: 104321-6
MW: 1834.12
Lot No.: WB176877-P190124

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV
Detector: 1.5 kV
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50% H₂O/50% ACN



HPLC Report

Structure: VK-15

Sequence: [H]-VTKLNGYYITSYVKK-[OH]

Order ID/Name: 104321-7/Item-7

Lot No.: WB176878-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:**

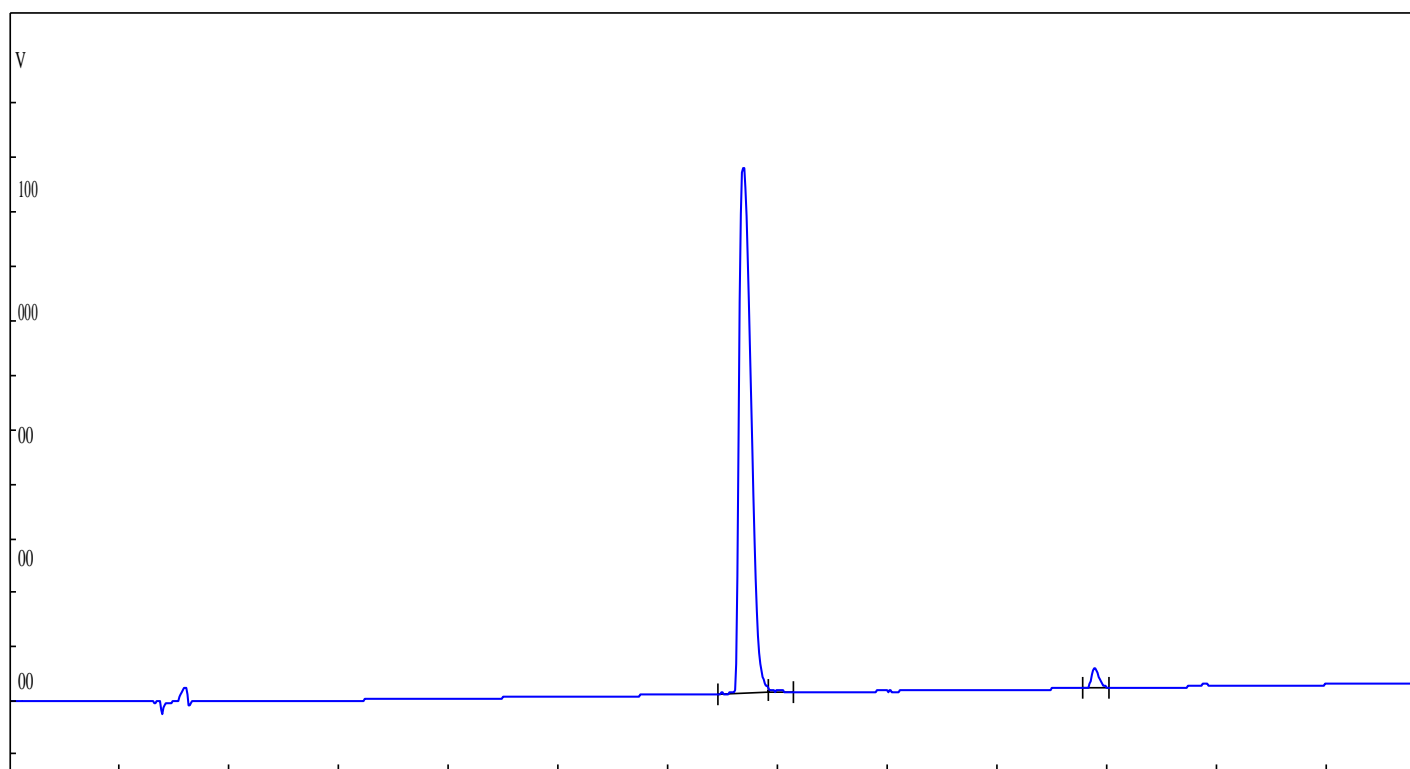
0.01min 85% 15%

25min 60% 40%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl

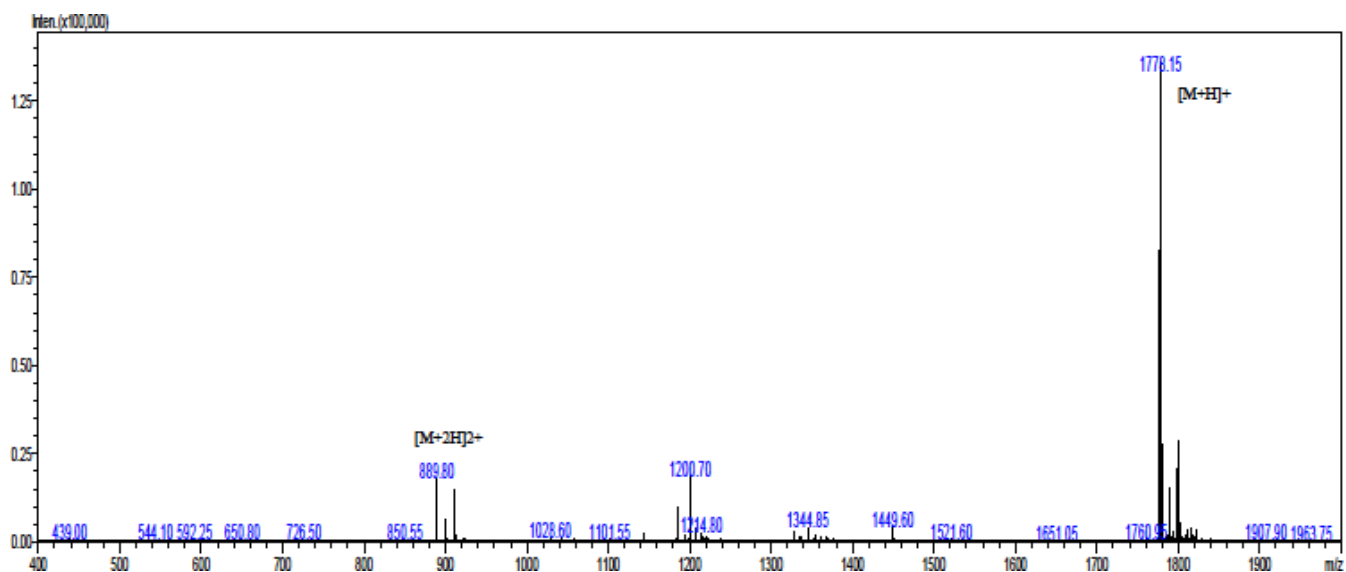


Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	13.346	963996	13268206	97.44
2	13.825	5530	48741	0.358
3	19.755	34890	29970	2.201
Total				100.0000

Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-7
Sequence: [H]-VTKLNGYYITSYVKK-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019	Probe: ESI	Probe bias: 4.5 kV
Acquired by: SHAO	Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min	Detector: 1.5 kV
Injection Volume: 1	CDL: -20.0 V	T.Flow: 0.2 mL/min
Sample Name: 104321-7	CDL Temp: 250 °C	B.conc: 50% H ₂ O/50% ACN
MW: 1777.11	Block Temp: 200 °C	
Lot No.: WB176878-P190124		



HPLC Report

Structure: DV-15

Sequence: [H]-DESKALFIYSTGYGV-[OH]

Order ID/Name: 104321-8/Item-8

Lot No.: WB176879-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:**

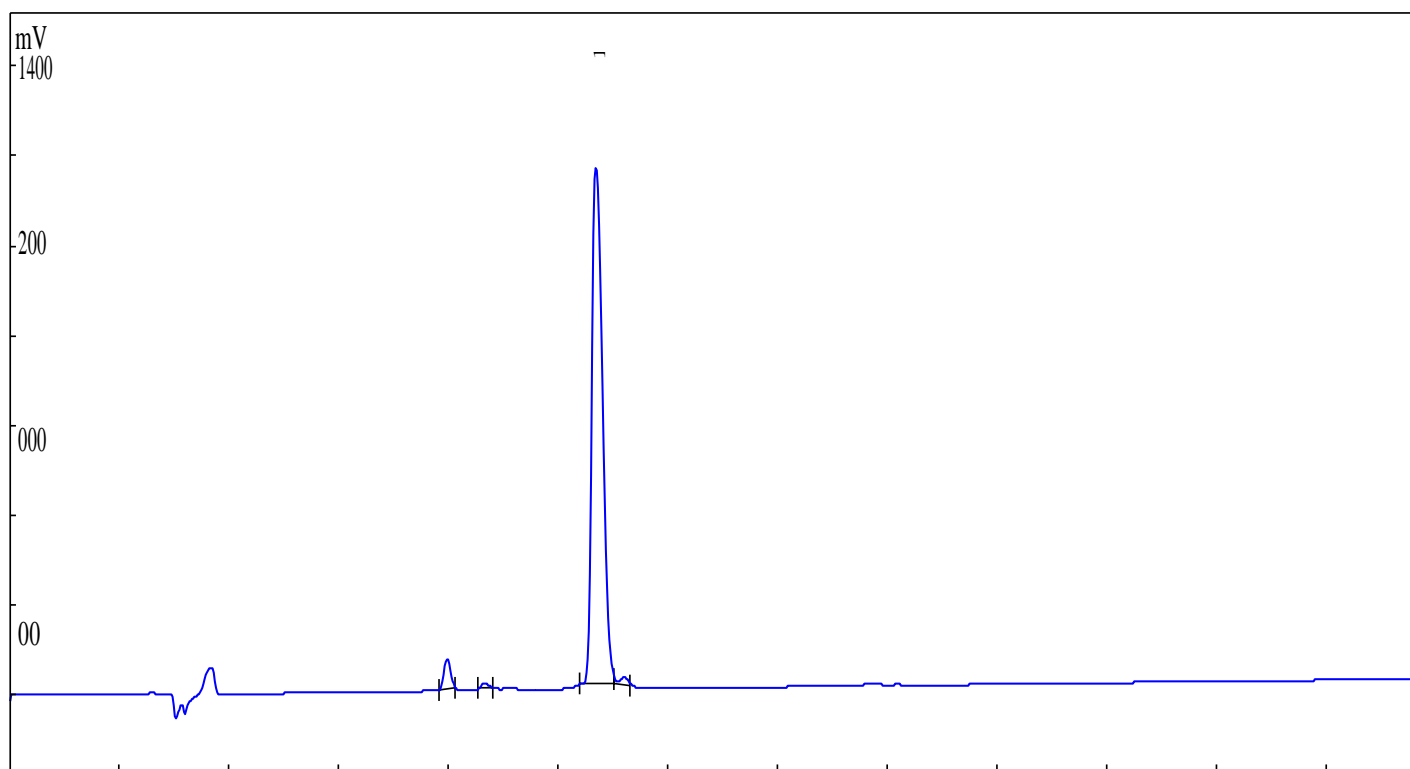
0.01min 80% 20%

25min 55% 45%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	7.951	64440	490241	3.281
2	8.630	10318	76691	0.5132
3	10.662	1147772	14217869	95.16
4	11.176	15994	156839	1.05
Total				100.0000

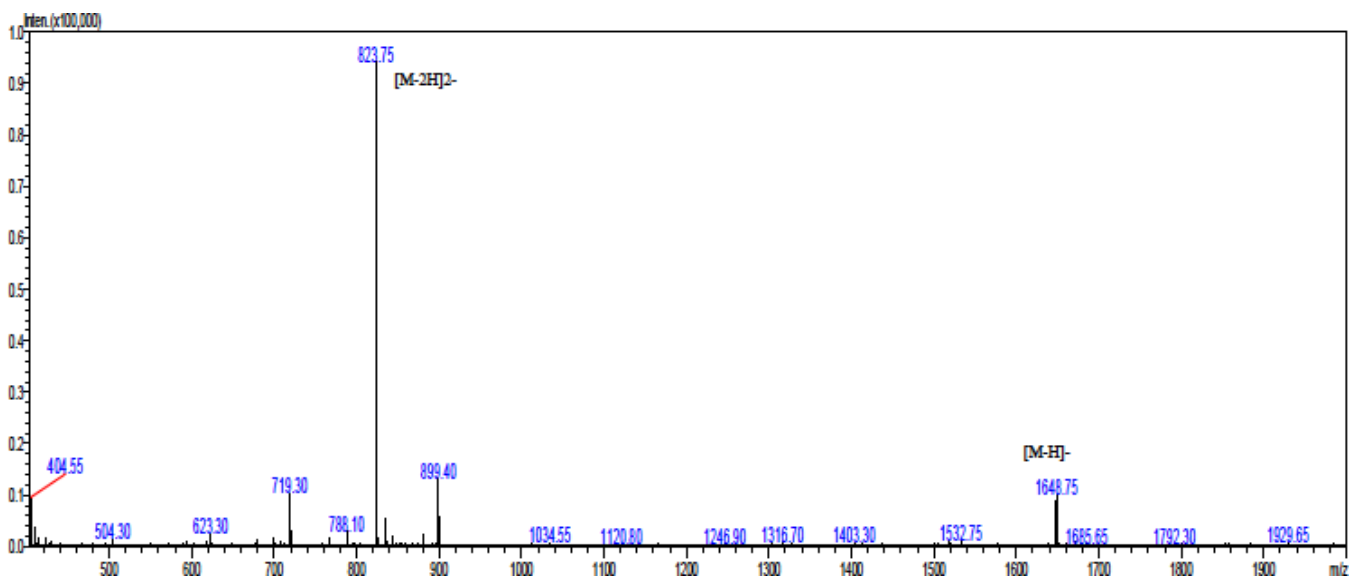
Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-8
Sequence: [H]-DESKALFIYSTGYGV-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019
Acquired by: SHAO
Injection Volume: 1
Sample Name: 104321-8
MW: 1649.83
Lot No.: WB176879-P190124

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV
Detector: 1.5 kV
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50% H₂O/50% ACN



HPLC Report

Structure: DN-15

Sequence: [H]-DEFGFYFYSRISTNN-[OH]

Order ID/Name: 104321-9/Item-9

Lot No.: WB176880-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:**

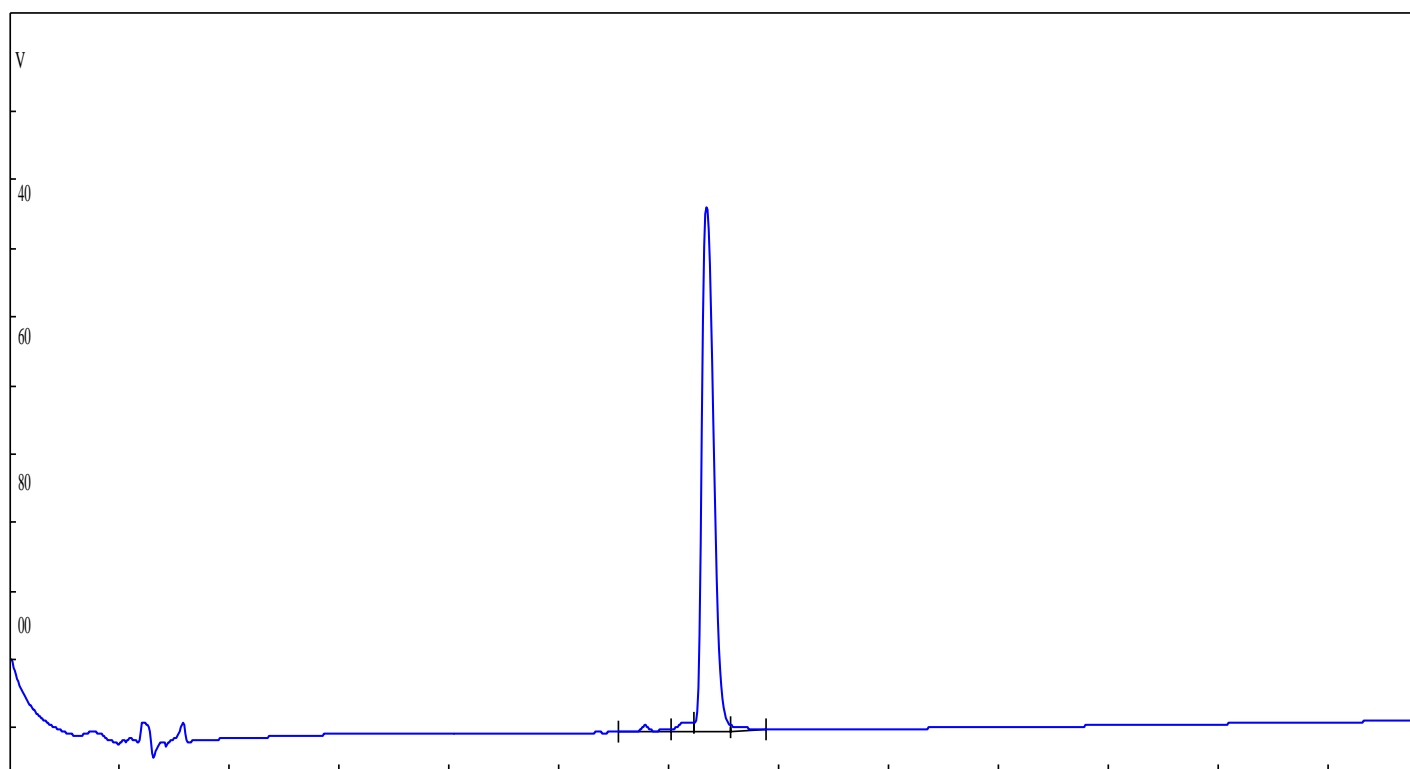
0.01min 75% 25%

25min 50% 50%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	11.538	7356	108340	1.234
2	12.319	11003	196907	2.243
3	12.659	612535	8386622	95.53
4	13.120	5146	86790	0.9887
Total				100.0000

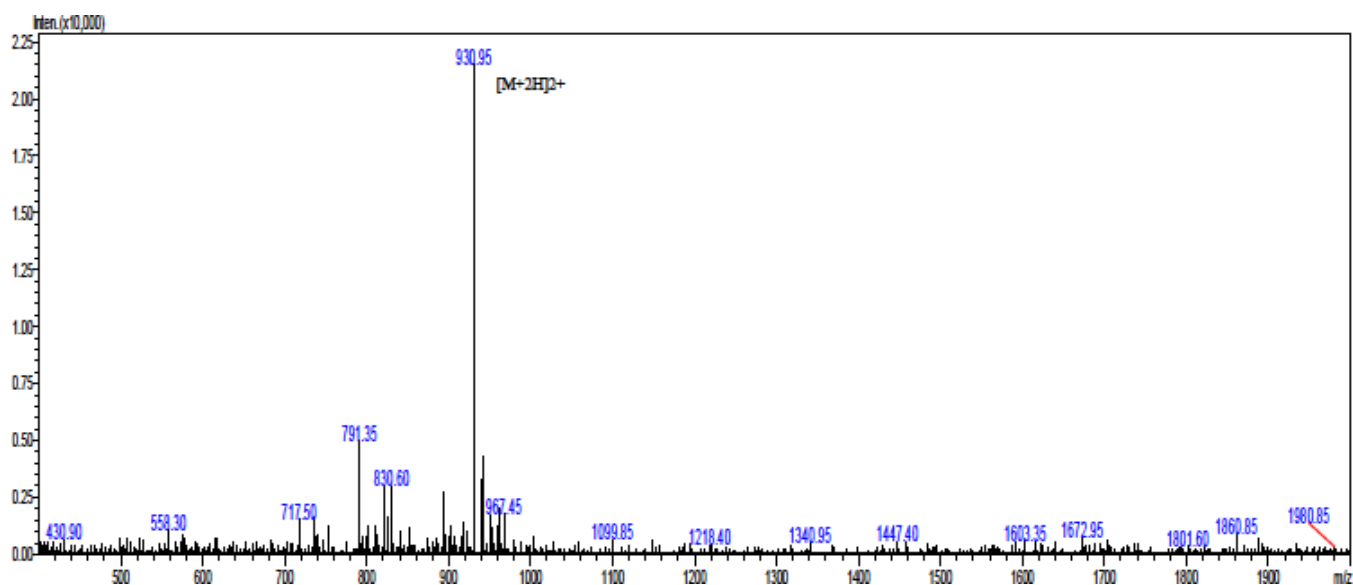
Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-9
Sequence: [H]-DEFGFYFYSRISTNN-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019
Acquired by: SHAO
Injection Volume: 1
Sample Name: 104321-9
MW: 1859.99
Lot No.: WB176880-P190124

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV
Detector: 1.5 kV
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50% H₂O/50% ACN



HPLC Report

Structure: FK-15

Sequence: [H]-FRNELYKTCIQHVIK-[OH]

Order ID/Name: 104321-10/Item-10

Lot No.: WB176881-P190124

Column: 4.6x250 mm, Boston

Green ODS-AQ **Solvent A:** 0.1% trifluoroacetic in 100% water

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in

100% acetonitrile **Gradient:**

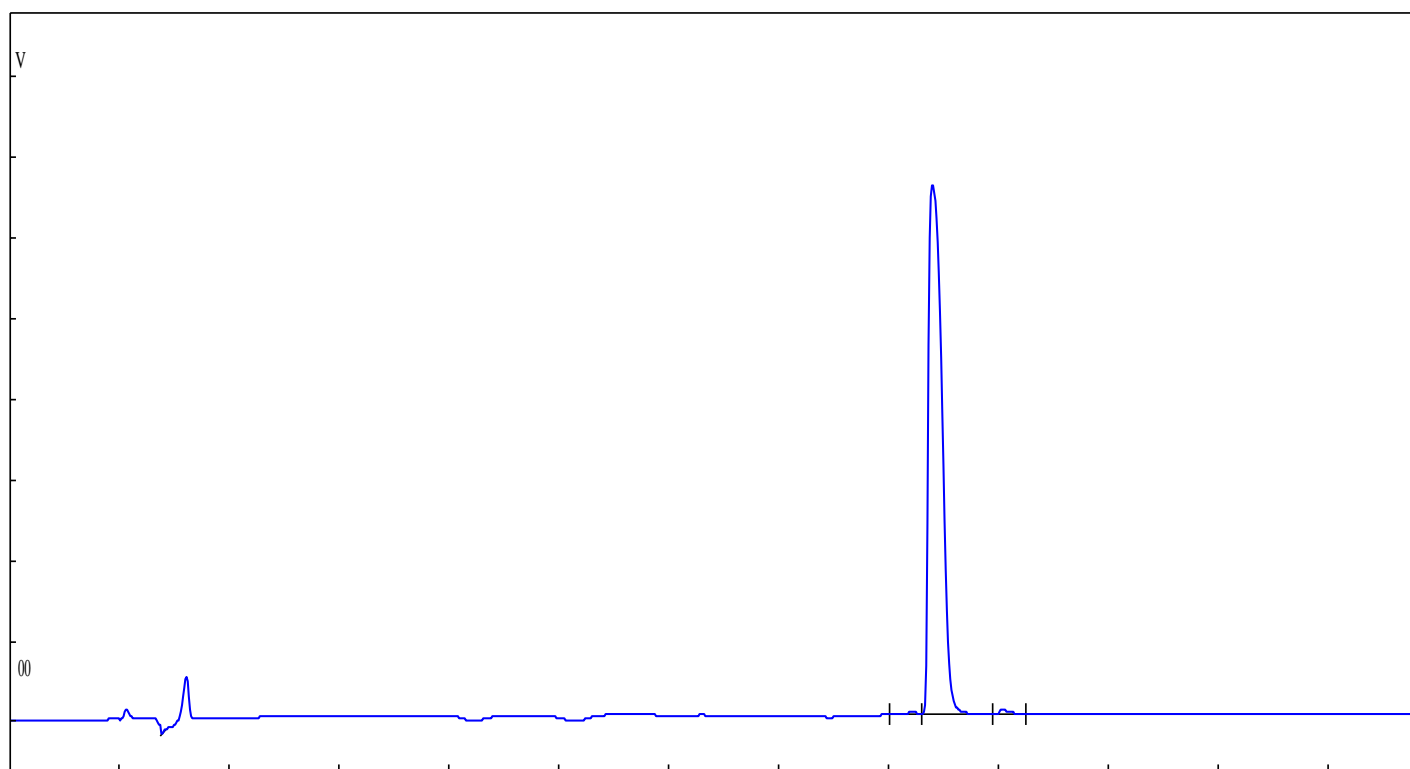
0.01min 82% 18%

25min 57% 43%

25.1min 0% 100%

30min STOP **Flow rate:** 1.0 mL/min **Wavelength:** 220 nm

Volume: 10 µl



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	16.404	7456	79929	0.3833
2	16.773	1309441	20612480	98.85
3	18.054	14457	160640	0.7703
Total				100.0000

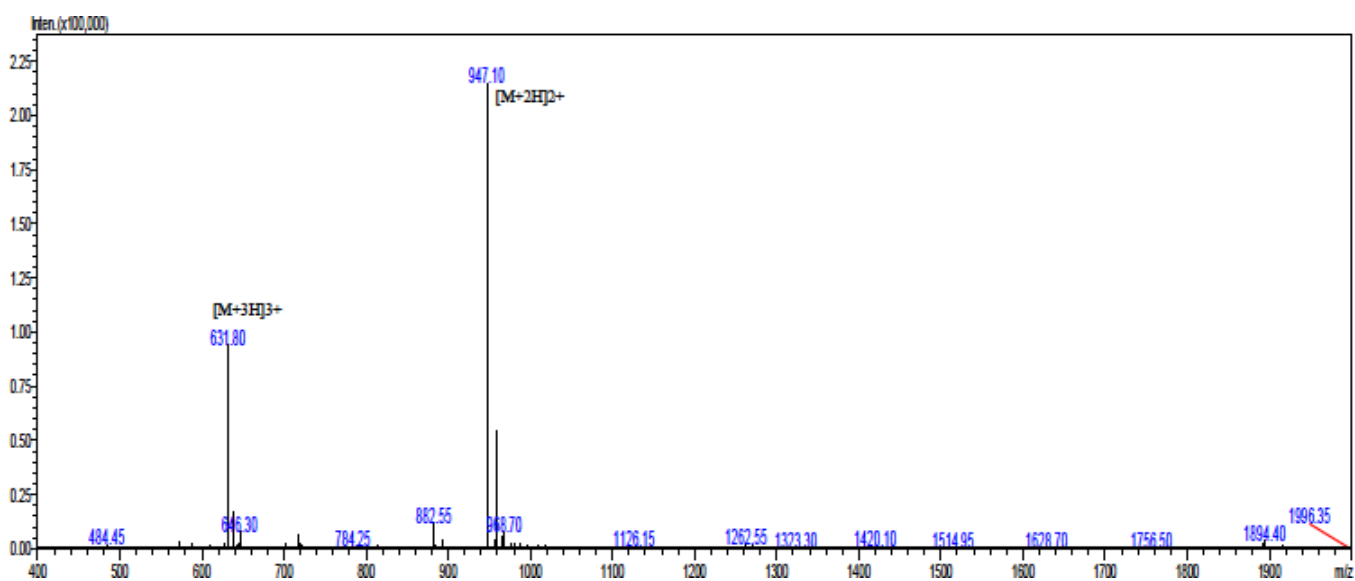
Mass Spectrum Report

Order ID: 104321-10
Sequence: [H]-FRNELYKTCIQHVIK-[OH]

Data Acquired: 2/15/2019
Acquired by: SHAO
Injection Volume: 1
Sample Name: 104321-10
MW: 1892.26
Lot No.: WB176881-P190124

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV
Detector: 1.5 kV
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50% H₂O/50% ACN





Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals From the Brazilian Amazon

Ada da Silva Matos¹, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva², Isabela Ferreira Soares¹, Barbara de Oliveira Baptista³, Rodrigo Medeiros de Souza⁴, Lana Bitencourt-Chaves¹, Paulo Renato Rivas Totino³, Juan Camilo Sánchez-Arcila⁵, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro³, César López-Camacho⁶, Arturo Reyes-Sandoval⁶, Lilian Rose Pratt-Riccio³ and Josué da Costa Lima-Junior^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Huji Xu,
Tsinghua University, China

Reviewed by:

Adrian John Frederick Luty,
Institut de Recherche Pour le
Développement (IRD), France
Takafumi Tsuboi,
Ehime University, Japan

*Correspondence:

Josué da Costa Lima-Junior
josue@ioc.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 May 2019

Accepted: 03 September 2019

Published: 20 September 2019

Citation:

Matos AS, Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Baptista BO, de Souza RM, Bitencourt-Chaves L, Totino PRR, Sánchez-Arcila JC, Daniel-Ribeiro CT, López-Camacho C, Reyes-Sandoval A, Pratt-Riccio LR and Lima-Junior JC (2019) Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals From the Brazilian Amazon. *Front. Immunol.* 10:2230. doi: 10.3389/fimmu.2019.02230

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ²Laboratory of Monoclonal Antibodies Technology, Institute of Immunobiology Technology, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ³Laboratory of Malaria Research, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Centre for Health Sciences and Sport, Federal University of Acre (UFAC), Cruzeiro Do Sul, Brazil, ⁵Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, IOC, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁶Nuffield Department of Medicine, The Jenner Institute, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) is essential for sporozoite motility and the invasion of mosquitoes' salivary gland and vertebrate's hepatocyte and is, thus, considered a promising pre-erythrocytic vaccine candidate. Despite the existence of a few reports on naturally acquired immune response against *Plasmodium vivax* TRAP (PvTRAP), it has never been explored so far in the Amazon region, so results are conflicting. Here, we characterized the (IgG and IgG subclass) antibody reactivity against recombinant PvTRAP in a cross-sectional study of 299 individuals exposed to malaria infection in three municipalities (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima and Guajará) from the Acre state of the Brazilian Amazon. In addition, the full PvTRAP sequence was screened for B-cell epitopes using *in silico* and *in vitro* approaches. Firstly, we confirmed that PvTRAP is naturally immunogenic in the cohort population since 49% of the individuals were IgG-responders to it. The observed immune responses were mainly driven by cytophilic IgG1 over all other subclasses and the IgG levels that was correlated with age and time of residence in the studied area ($p < 0.05$). Interestingly, only the levels of specific anti-TRAP IgG3 seemed to be associated with protection, as IgG3 responders presented a significantly higher time elapse since the last malaria episode than those recorded for IgG3 non-responders. Regarding the B-cell epitope mapping, among the 148 responders to PvTRAP, four predicted epitopes were confirmed by recognition of antibodies (PvTRAP_{R197-H227}; PvTRAP_{E237-T258}; PvTRAP_{P344-G374}; and PvTRAP_{E439-K454}). Nevertheless, the frequency of responders against these peptides were low and did not show a clear correlation with the antibody response against the corresponding antigen.

Moreover, none of the linear confirmed epitopes were located in the binding regions of PvTRAP in respect to the host cell ligand. Collectively, our data confirm the PvTRAP immunogenicity among Amazon inhabitants, while suggesting that the main important B-cell epitopes are not linear.

Keywords: malaria, *Plasmodium vivax*, PvTRAP, humoral immune response, epitope mapping

INTRODUCTION

Malaria is caused by parasites belonging to the *Plasmodium* genus. Two species are considered the main etiological agents: *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* (1). *P. falciparum* is more prevalent in Africa and is responsible for most cases of death around the world, and *P. vivax* is prevalent in the Americas (2). Despite several pre-clinical and a few clinical trials aiming for a global *P. vivax* vaccine development, there is still no licensed vaccine available.

The leading vaccine candidates against *P. vivax* are designed to tackle the pre-erythrocytic stage of lifecycle, and the sporozoite protein TRAP (*thrombospondin-related adhesive protein*) has been considered a promising candidate antigen. TRAP is a highly conserved transmembrane *Plasmodium* protein belonging to the TRAP/Micronemal protein 2 family (TRAP / MIC2). It is required for sporozoite motility and, in conjunction with the circumsporozoite (CS) protein, is essential for sporozoite invasion in the salivary gland of the mosquito and vertebrate hepatocytes (3, 4). Structurally, TRAP contains an N-terminal hydrophobic sequence (domain I), an integrin A-type magnesium binding Domain (domain II), a thrombospondin type I replications (domain III), an acid proline/asparagine domain region (IV), a hydrophobic transmembrane domain (V domain), and a cytoplasmic tail region (5). Sporozoite locomotion is mediated by the subpellicular actomyosin system that binds to the cytoplasmic tail of TRAP (6). Despite the functional importance of TRAP in parasite survival, analysis of *P. falciparum* TRAP (PfTRAP) and *P. vivax* (PvTRAP) loci of clinical isolates revealed a small sequence heterogeneity (7).

The potential of TRAP as vaccine antigen is currently supported by several reports of immunogenicity and protection in mice, non-human primates and humans. For instance, in a murine model, co-immunization of CSP with TRAP provided complete protection against a parasite challenge, whereas vaccination using only CSP provided only partial protection (8). In monkeys, immunization with synthetic peptides representing domain II of PvTRAP was able to protect 2/3 of the challenged animals with *P. vivax* sporozoites (9). In humans, Phase IIa clinical trials with PfTRAP showed complete sterile protection in more than 20% of vaccinated individuals and delayed patency in 58% (10). In fact, TRAP-specific CD8⁺ T lymphocytes seem to be key mediators in the protection against sporozoite challenge in mouse vaccination assays (11) and in clinical trials with PfTRAP-vaccinated human individuals (10). However, antibodies are also important players in protection due to its activity on sporozoite motility/invasion blocking (12, 13) and, in this context, recent sero-epidemiological studies showed

that anti-PfTRAP antibodies were negatively correlated with parasite density among infected individuals in malaria endemic areas (14, 15).

However, there is still little knowledge about TRAP natural antigenicity in *P. vivax*-exposed populations. Epidemiological, genetic, and environmental factors can influence the development of immunity against malaria parasites, and the understanding of humoral immune responses is relevant because the knowledge of the specific patterns of antibodies response across different endemic areas worldwide can improve the vaccine development process (16). Moreover, since antibodies recognize antigens through their binding to B-cells epitopes, the prediction of epitopes recognized by the immune humoral response can allow the development of epitope-based vaccines (17–19). Our present study provides, for the first time, an evaluation of the antibody response to PvTRAP in individuals of the Brazilian Amazon, by characterizing the specific profile of PvTRAP IgG subclasses antibodies and identifying linear B-cell epitopes that participate in the natural immune acquired response. Results are discussed along with data on individual exposure and protection.

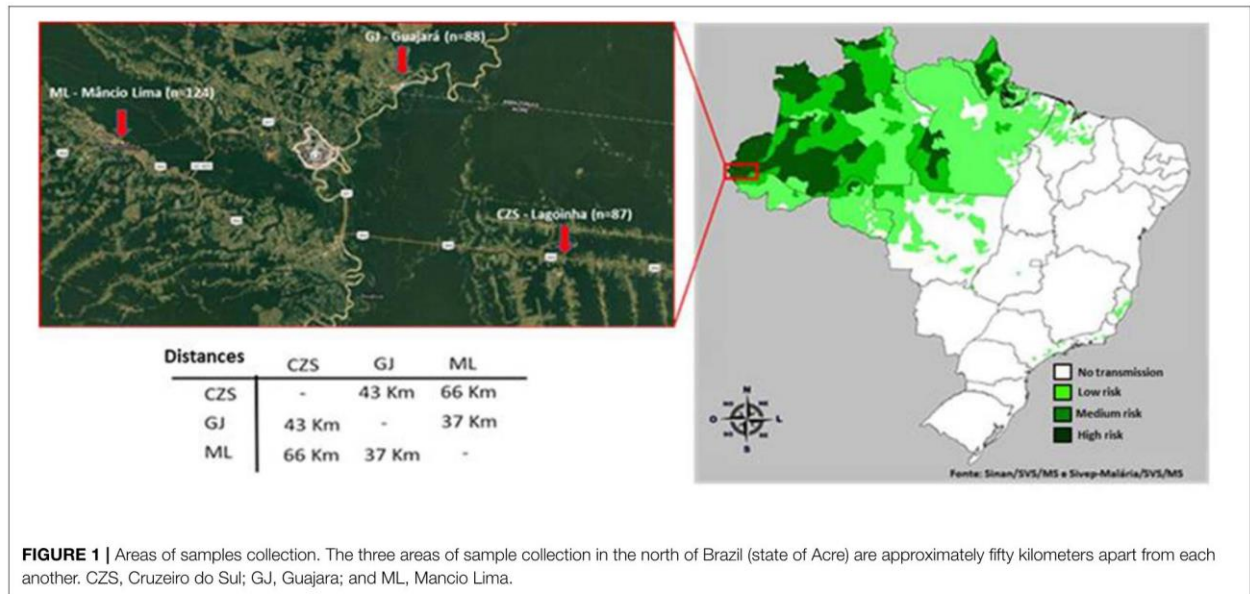
MATERIALS AND METHODS

Study Area and Volunteers

A cross-sectional cohort study was conducted involving 352 individuals from three different endemic areas of Acre (**Figure 1**): Cruzeiro do Sul ($n = 124$), Guajará ($n = 87$), and Mâncio Lima ($n = 88$). Fifty-three samples from individuals living in non-endemic areas from Rio de Janeiro were considered the control group. Samples and survey data were collected from June 2016 to August 2016. Written informed consent was obtained from all donors and the study was reviewed and approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248).

Epidemiological Survey

In order to evaluate the possible influence of epidemiological factors on humoral immunity against PvTRAP, all donors were interviewed. The survey included questions related to personal exposure to malaria, such as years of residence in the endemic area, recorded individual and family previous malaria episodes, use of malaria preventive measures, presence/absence of symptoms, and personal knowledge on malaria transmission. The volunteers answered the questions and all epidemiological data were stored in Epi-Info (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) for subsequent analysis.



Malaria Diagnosis and Blood Sampling

Peripheral blood samples were collected by venipuncture in heparin tubes. After centrifugation ($350 \times g$, 10 min), the plasma was collected and stored at -20°C and transported to our laboratory. Thin and thick blood smears of all donors were examined for malaria parasites. Parasitological evaluation was done by examination of 200 fields at $1,000\times$ magnification under oil-immersion and a research expert in malaria diagnosis examined all slides. All donors found positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at blood smears were subsequently treated using the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

Recombinant PvTRAP

For the expression and purification of PvTRAP protein, the codon-optimized gene of *P. vivax* TRAP (UniProt A5K806, residues Asp25 to Lys493) was cloned into the pHLsec vector (20), which is flanked by the chicken β -actin/rabbit β -globin hybrid promoter with a signal secretion sequence and a Lys-His6 tag. Endogenous PvTRAP secretion signal (a.a. 1-24) was replaced by a signal sequence contained in the pHLsec mammalian expression plasmid (MGILPSPGMPALLSLVSLLSVLLMGCVA). In order to improve secretion of the PvTRAP protein, the C-terminal region of PvTRAP (a.a. 494-556) was deleted. The pHLsec PvTRAP plasmid (500 μg) was transfected in HEK-293T cells using polyethyleneimine (PEI) in roller bottles (surface area of 2,125 cm^2) under standard cell culture conditions. Five days after transfection cells were discarded and media was filtered through 0.22 μM disposable filters. The secreted protein was purified from the supernatant by Nickel Sepharose affinity chromatography (HisTRAPTM, GE Healthcare), using the Äkta

Start chromatography system and eluted with Imidazole 500 mM. Finally, eluted protein was dialyzed using Slide-A-LyzerTM cassette (Fisher Scientific) against 1X PBS.

ELISA

Antibody binding to PvTRAP was evaluated on plasma samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, MaxiSorp 96-well-plates (Nunc, Rochester, NY, USA) were coated with PBS containing 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of recombinant PvTRAP. After overnight incubation at 4°C , the plates were washed with PBS-Tween and blocked for 1 h at 37°C . Plasma samples diluted 1:100 in PBS-Tween containing 5% non-fat dry milk (PBS-Tween-M) were added in duplicate wells for each individual. After 1 h at 37°C and three washings procedures, specific antibodies were detected by peroxidase-conjugated anti-human IgG (Sigma, St. Louis) and followed by the addition of o-phenylenediamine and hydrogen peroxide. Optical density was accessed at 490 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Results for total IgG were expressed as reactivity indexes (RIs), which represent the mean optical density of each tested sample divided by the mean optical density of 10 non-exposed control individuals' samples plus 3 standard deviations. Subjects were scored as responders to PvTRAP if the RI of IgG against the recombinant protein was higher than 1. Additionally, IgG subclasses were evaluated on responders by the same method, using peroxidase-conjugated goat anti-human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (clone HP-6001 for IgG1, HP-6002 for IgG2, HP-6050 for IgG3, HP-6023 for IgG4 -Sigma, St. Louis).

B-Cell Epitope Prediction

To predict linear B-cell epitopes on entire sequences of PvTRAP (U64901.1; Salvador 1), we used a combination of three prediction algorithms: BCPreds (<http://ailab.ist.psu>).

edu/bcpred/predict.html), BepiPred1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred-1.0/>), and ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred>). BepiPred 1.0 (21) is based on hidden Markov model profiles of known antigens, and also incorporates hydrophobicity and secondary structure prediction. We used the recommended cutoff of 0.90 to determine potential B-cell linear epitopes. Furthermore, ABCpred and BCpreds are both based learning methods of the machine. In this study, we considered threshold values of 0.3, 0.51, and 75% to BepiPred, ABCpred, and BCpreds, respectively. All sequences with more than 10 amino acids and predicted for at least two of prediction algorithms were considered as a linear B-cell epitope and evaluated by antigenicity using the Vaxijen algorithm (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). VaxiJen is the first server for alignment-independent prediction of protective antigens. It was developed to allow antigen classification solely based on the physicochemical properties of proteins without recourse to sequence alignment. Bacterial, viral and tumor protein datasets were used to derive models for the prediction of whole protein antigenicity, showing prediction accuracy from 70 to 89% (22). To evaluate the antigenicity of predicted epitopes we used the threshold of 0.6. All predicted epitopes with a Vaxijen score higher than threshold value (0.6) were selected to experimental validation.

Peptide Synthesis

After a consensual analysis of the *in silico* prediction tools, four peptide sequences appeared as relevant epitopes within PvTRAP. Therefore, the sequences were synthesized by fluorenylmethoxycarbonyl (F-moc) solid-phase chemistry (23) (GenOne Biotechnologies, Brazil). Analytical chromatography of the peptides demonstrated a purity of >95% and the mass spectrometric analysis also indicated the estimated masses for each of them: 3395.78 g/mol (peptide PvTRAP_{R197–H227}), 2332.61 g/mol (peptide PvTRAP_{E237–T258}), 3487.59 g/mol (peptide PvTRAP_{P344–G374}), and 2333.55 g/mol (peptide PvTRAP_{E439–I460}).

Confirmation of B-Cell Epitopes (Peptide ELISA)

To confirm the overlapping epitopes detected with the prediction programs, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed. MaxiSorp 96-well-plates (Nunc, Rochester, NY, USA) were coated with PBS containing 0.5 µg/ml of each peptide, followed by overnight incubation at 37°C. The plates were washed and blocked with BSA 4% for 1 h and 30 min at 37°C in the humid incubator. After this, the individual plasma samples were diluted 1:100 in PBS-Tween containing BSA 2% in duplicate wells. After 2 h at 37°C in the humid incubator, and three washings with PBS-Tween, bound antibodies were detected with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Sigma, St. Louis) and followed by the addition of o-phenylenediamine and hydrogen peroxide. Optical density was identified at 490 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). As made for recombinant protein, the results for each peptide were expressed as reactivity indexes (RIs), which were calculated by the mean optical density of

an individual's tested sample divided by the mean optical density of 10 non-exposed control individuals' samples plus 3 standard deviations.

Statistical Analysis

All statistical analyses were carried out using Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.). The one-sample Kolmogorov–Smirnov test was used to determine whether a variable was normally distributed. The Mann–Whitney test was used to compare RIs of IgG against recombinant PvTRAP between studied groups. Differences in proportions of the RI of IgG subclasses and epidemiological parameters were evaluated by Fisher's exact test and associations between antibody responses and epidemiological data were determined by Spearman rank test. A two-sided $p < 0.05$ was considered significant.

We used a principal component analysis (PCA) to detect the variation pattern of Anti-PvTRAP total IgG, age, time of residence in endemic area, time since last infection response, and number of previous malaria infections. Our objective was to reduce dimensionality of multivariate data to detect the variables that explained the variance structure of the data. Each axis of PCA, hereafter named Principal Component (PC) represents the amount of variation associated to this axis. Each variable studied in the PCA has a loading value indicating its contribution to each PC. In the graph, individuals are represented as points located between principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2). Variables are represented as arrows and its longitude represent its contribution to the variation of data. Additionally, closer angles between variables (arrows), represents more correlated variables, and angles closer to 90° represent independence between variables (orthogonality).

To evaluate total IgG responses to PvTRAP peptides and compare with PvTRAP recombinant protein, we constructed a two-dimensional heatmap with hierarchical clustering grouping individuals with similar responses and the responses for peptides and recombinant PvTRAP. We calculated Z-scores from transformed total IgG values for PvTRAP peptides and recombinant protein: $Z\text{-score} = [(PvTRAP \text{ peptides/recombinant protein total IgG values} - \text{population PvTRAP peptides/recombinant protein total IgG mean value}) / \text{population PvTRAP peptides/recombinant protein total IgG standard deviation}]$. Clustering was performed from Z-scores using Euclidean distance metrics and Ward as the linkage algorithm. PCA was constructed using vegan package (24) and a two-dimensional heatmap was build using gplots package (25) in R statistical environment (26).

RESULTS

Epidemiological Profile of Studied Individuals

The studied population is composed of 299 individuals living in three close municipalities of the Brazilian Amazon. The majority was composed by adults and all individuals were naturally exposed to malaria infection (Table 1). The age range was 12–88 years with an average of 35 years, and the cohort presented a similar prevalence in gender (male = 48.3%; female = 51.7%).

TABLE 1 | Summary of the epidemiological characteristics of studied individuals enrolled in the survey.

Epidemiological features	Total
	(N = 299)
	N (%)
Gender	
Male	48.3%
Female	51.7%
Malaria exposure	Mean (\pmSD)
Age	35 (\pm 15.97)
Time of residence in the endemic area	34 (\pm 16.10)
Time of residence in the present address	24 (\pm 19.35)
Months since the last malaria episode	33 (\pm 57.07)
Number of malaria episodes on the last year	0.82 (\pm 1.13)
Number of previous malaria episodes	10 (\pm 12.41)
Previous species contracted	N (%)
<i>P. vivax</i>	56 (19%)
<i>P. falciparum</i>	16 (5%)
<i>P. vivax</i> and <i>P. falciparum</i>	186 (62%)
Never infected	7 (2%)
Not reported	34 (11%)
Diagnosis	N (%)
<i>P. vivax</i>	73 (24.4%)
<i>P. falciparum</i>	41 (13.7%)
Mixed	4 (1.3%)
Negative	181 (60.5%)
Species of the last infection	N (%)
<i>P. vivax</i>	173 (48%)
<i>P. falciparum</i>	62 (17%)

Values of age, time of residence in endemic areas (TREA) and time of residence in the present address (TRPA), months since the last malaria episode (MSLM), number of malaria episodes on the last year, and number of previous malaria episodes (NPME) are represented by mean (with standard variation values). The frequency of individuals regarding to malaria diagnosis, previous infections and species of the last infection was compared by Fisher's test, and other epidemiological parameters were compared by Mann-Whitney test. We can observe that the prevalence of *P. vivax* cases is significantly higher than that of *P. falciparum* cases ($p < 0.0001$).

The time of residence in malaria endemic area (TREA) ranged from 3 to 88 years, which indicated different degrees of exposure among the studied individuals. With regards to prior history of malaria infections, 11% of all studied individuals did not remember having had previous malaria episodes (PME) and 2% did not report any malaria episode during their entire life. Sixty-two percent informed us of previous episodes of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria during their entire life, which are the two prevalent species in Brazil. The number of past infections reported by individuals also varied greatly, ranging from 0 to 48 (mean = 8.62 ± 10.24) and the time elapsed since the last infection (TLI) varied from 0 to 240 months (mean = 33.5 ± 57.1). Finally, at the time of blood collection, 118 (39.5%) individuals were naturally infected with *Plasmodium* sp. The frequency of *P. vivax* infections (24.4%) was significantly higher than that of *P. falciparum* infections (13.7%; $p = 0.0016$). Collectively, the parameters evaluated indicated that the studied population are naturally exposed to malaria, but have different degrees of exposure and/or immunity.

Frequency and Magnitude of IgG Immune Response Against Recombinant PvTRAP

To verify if PvTRAP is a target of naturally acquired humoral response against *P. vivax* in Brazilian amazon individuals, we assessed the IgG reactivity against the recombinant antigen. Firstly, we confirmed that PvTRAP is immunogenic in naturally exposed individuals from the Brazilian Amazon, as 148 (49%) individuals presented specific antibodies against the recombinant PvTRAP (Figure 2A) with no significant difference among *P. vivax* or *P. falciparum* infected individuals and exposed but non-infected individuals (Figure S1). Among responders, the reactivity indexes (RI) values ranged from 1.01 to 4.29 (mean = 1.55 ± 0.48). We also assessed the overall distribution of the IgG antibody subclass responses to PvTRAP protein using different comparative analyses. Secondly, we determined subclass-specific prevalence in total IgG positive responders, in which IgG1 was the most prevalent subclass present in 68% of responders (Figure 2B), followed by IgG3 (49%) and IgG2 (45%). The subclass with the lower frequency was IgG4 (16%). The frequency of IgG1 responders was significantly higher when compared to IgG2 ($p = 0.0002$), IgG3 ($p = 0.0021$), and IgG4 ($p < 0.0001$). Thirdly, in relation to magnitude of antigen-specific IgG subclass responses, a wide distribution of RIs was observed, which ranged from 0.28 observed in IgG2 to 18.33 in IgG1. However, the overall mean of specific subclass RIs indicate that IgG1 cytophilic antibodies against PvTRAP (mean = 1.53 ± 1.91) was also significantly higher ($p < 0.0001$) than all other subclasses (IgG2 = 1.17 ± 0.93 , IgG3 = 1.08 ± 0.47), and IgG4 (mean = 0.76 ± 0.60).

Influence of Malaria Exposure on Naturally Acquired IgG Against PvTRAP

In order to identify the contribution of epidemiological data on the variation observed in humoral response to PvTRAP, data was matched with the magnitude and frequency of responses to PvTRAP. Firstly, we noted that the distribution of individuals into ordination space was homogeneous, without evident groups into it. Age and TREA were highly correlated, and previous malaria infections as well as time since last malaria infection were negatively correlated between them. However, only age and TREA was related to RIs against PvTRAP IgG to data variation. The nature of variables relationship was confirmed by calculating the correlation between the anti-PvTRAP IgG reactivity index and age ($r = 0.190$; $p = 0.001$) and TREA ($r = 0.194$; $p = 0.001$). Antibody levels and the number of previous infections were orthogonal variables and we also did not observe correlation ($r = 0.013$; $p = 0.832$). A similar result was observed in the PCA for anti-PvTRAP IgG reactivity index and time elapsed since the last malaria episode ($r = -0.051$; $p = 0.398$) (Figure 3). Regarding the IgG subclass and malaria exposure and/or indicatives of protection, there was no significant difference between subclass responders and non-responders in relation to TREA or PME. However, interestingly, the time elapsed since the last malaria episode was significantly higher in TRAP-specific IG3 responders than non-responders (Figure 4). This finding was corroborated by the observed

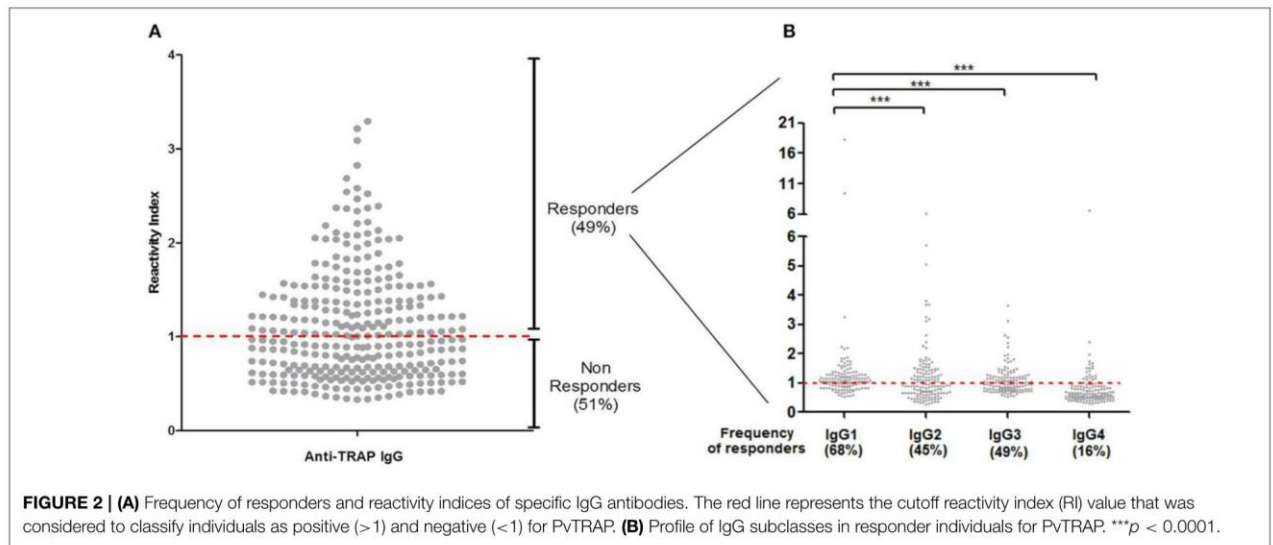


FIGURE 2 | (A) Frequency of responders and reactivity indices of specific IgG antibodies. The red line represents the cutoff reactivity index (RI) value that was considered to classify individuals as positive (>1) and negative (<1) for PvTRAP. **(B)** Profile of IgG subclasses in responder individuals for PvTRAP. *** $p < 0.0001$.

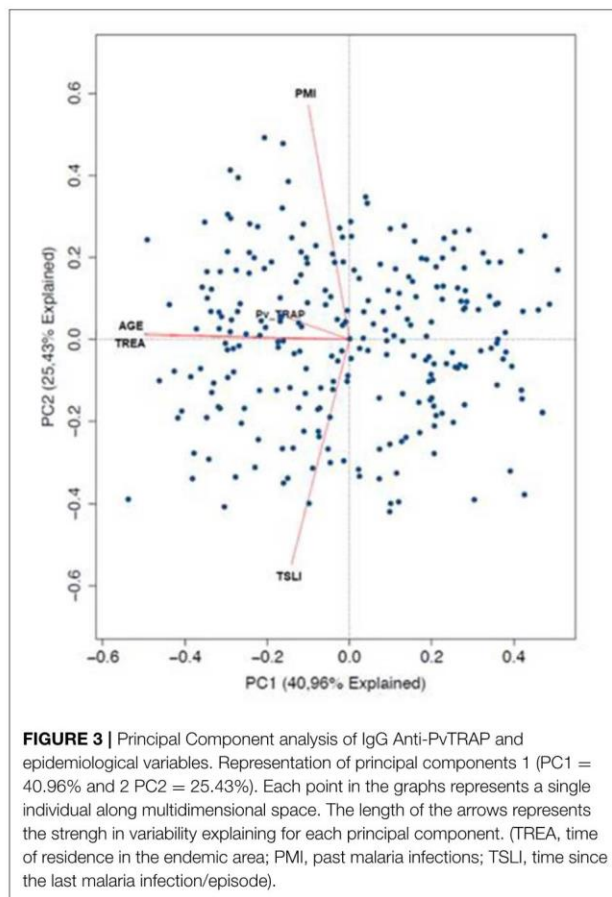


FIGURE 3 | Principal Component analysis of IgG Anti-PvTRAP and epidemiological variables. Representation of principal components 1 (PC1 = 40.96% and 2 PC2 = 25.43%). Each point in the graphs represents a single individual along multidimensional space. The length of the arrows represents the strength in variability explaining for each principal component. (TREA, time of residence in the endemic area; PMI, past malaria infections; TSLI, time since the last malaria infection/episode).

correlation between IgG3 RIs against PvTRAP and the time elapsed since the last malaria episode ($r = 0.184$; $p = 0.0032$).

In silico Prediction of B-Cell Linear Epitopes of PvTRAP

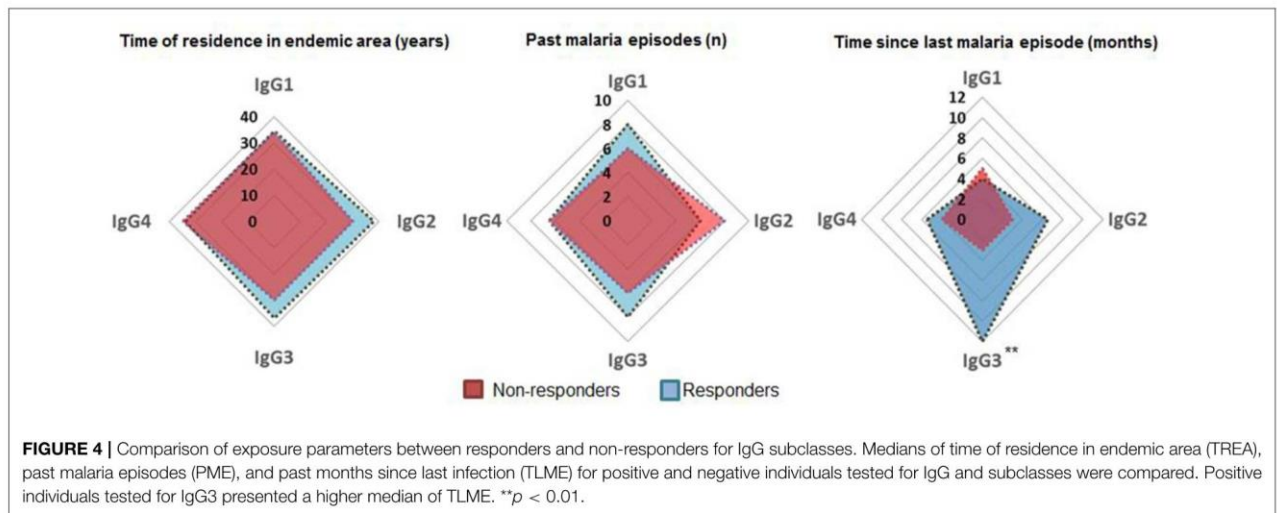
Firstly, five sequences were predicted as potential linear B-cell epitopes on PvTRAP (PvTRAP_{R197–H227}, PvTRAP_{E237–T258}, PvTRAP_{P260–K279}, PvTRAP_{P344–G374}, and PvTRAP_{E439–K454}) (Figure 5A). Among these sequences, four (PvTRAP_{R197–H227}, PvTRAP_{E237–T258}, PvTRAP_{P344–G374}, and PvTRAP_{E439–K454}) presented Vaxijen score higher than threshold value (0.6) and were considered antigenic epitopes selected to experimental validation. Regarding the localization of predicted antigenic linear B-cell epitopes, epitopes PvTRAP_{E237–T258}; PvTRAP_{P344–G374}, and PvTRAP_{E439–K454} were localized in repeat region of TRAP, while epitope PvTRAP_{R197–H227} was inserted in thrombospondin type I repeat (TSR) domain (Figure 5B).

Experimental Validation of Predicted Linear B-Cell Epitopes

To validate predicted antigenic epitopes of PvTRAP, we tested by ELISA the plasma from responders to the recombinant protein, against selected epitopes (PvTRAP_{R197–H227}, PvTRAP_{E237–T258}, PvTRAP_{P344–G374}, and PvTRAP_{E439–K454}).

Among the 148 responders to PvTRAP recombinant protein, as showed in Figure 6, all predicted epitopes (PvTRAP_{R197–H227}, PvTRAP_{E237–T258}, PvTRAP_{P344–G374}, and PvTRAP_{E439–K454}) presented low frequencies of responders (26, 25, 32, and 29%, respectively). Beside, peptide R_{197–H227} presented the lowest magnitude of response (median = 1.25 interquartile range = 1.13–1.47) when compared to PvTRAP_{E237–T258}, PvTRAP_{P344–G374}, or PvTRAP_{E439–K454} (median = 1.60 interquartile range = 1.22–2.65, $p = 0.003$; median = 1.87 interquartile range = 1.12–2.61, $p < 0.0001$; median = 1.44 interquartile range = 1.16–2.08, $p = 0.035$; respectively).

In order to investigate the protective role of antibodies against linear epitopes of PvTRAP, we compared epidemiological data from individuals who recognized at least one of the linear



epitopes with data from those who did not recognize linear epitopes. Interestingly, individuals who were responders to linear epitopes presented a lower mean of the time elapsed since the last malaria episode (mean = 23.97 ± 49.78) and a higher number of previous malaria episodes (mean = 13.35 ± 14.10) when compared to non-responders (mean = 40.20 ± 63.91 , $p = 0.0175$; mean = 8.35 ± 9.60 , $p = 0.005$, respectively).

In order to understand the profile of IgG directed to peptides and its relationship to IgG response detected against recombinant PvTRAP, we used a clustered bidimensional heatmap (Figure 7). In the vertical cluster localized in the left side of the heatmap, we noted that those peptides grouped in the first level of the cluster. PvTRAP_{E237–T258} and PvTRAP_{E439–k460} presented more similarity followed by PvTRAP_{R197–H227} and PvTRAP_{P344–G374}. The IgG responses were heterogeneous. IgG values for peptides were more similar between them compared to recombinant PvTRAP. Nevertheless, responses for recombinant PvTRAP were heterogeneous and not matched with high RI values for peptides. We also observed a mixed profile of responses including individuals that responded to recombinant PvTRAP but not to peptides, other non-responders to peptides and recombinant PvTRAP, and individuals that responded to peptides and recombinant PvTRAP.

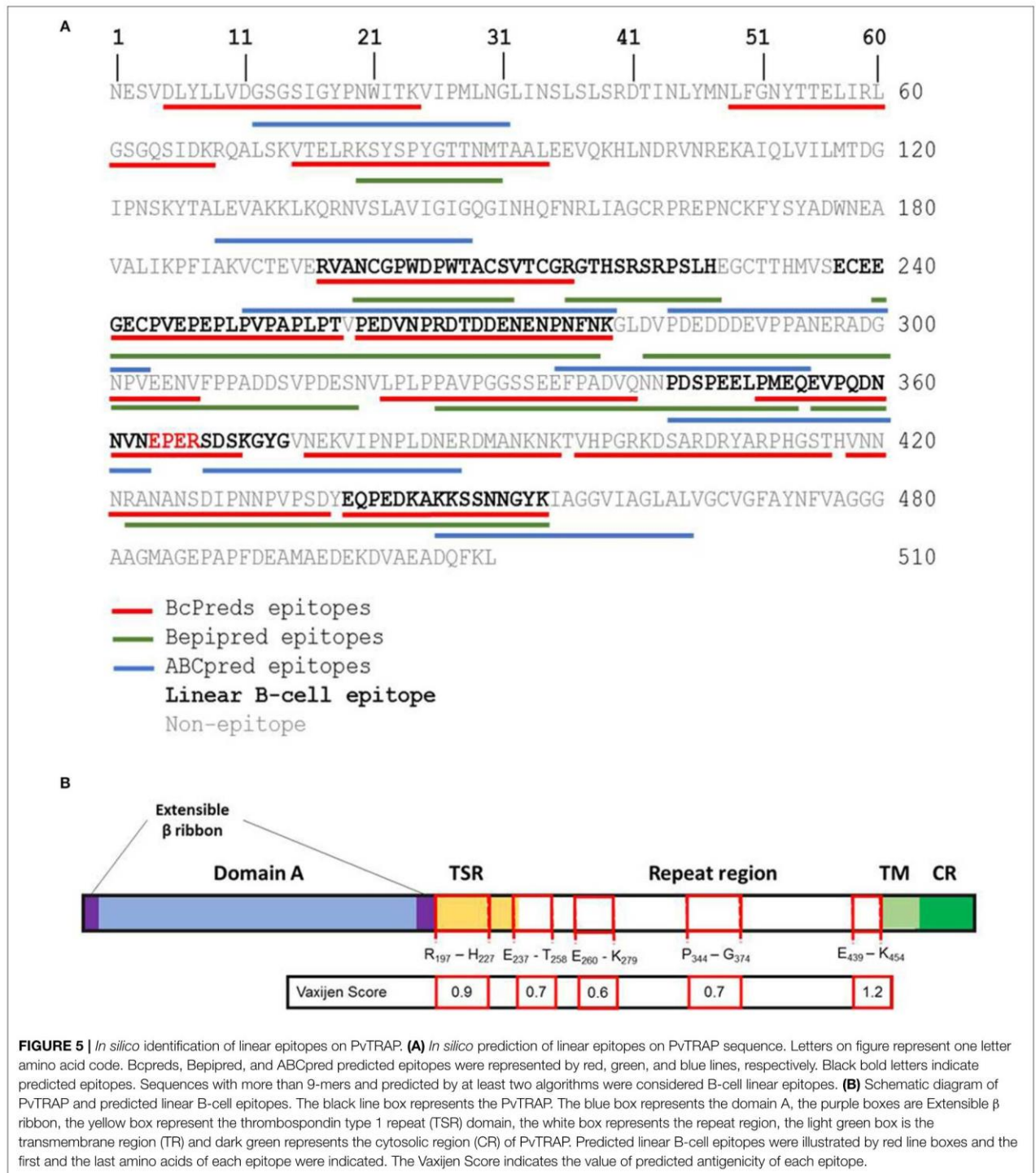
DISCUSSION

Despite numerous advances in the understanding of the biology of *Plasmodium vivax*, there is still no vaccine against this parasite. Recently, PvTRAP has emerged as a leading vaccine candidate (27). Sero-epidemiological studies have played a significant role in the identification of leading vaccine candidates (28), which underlies the importance of assessing the immune response against PvTRAP and its role in immunity in exposed individuals from endemic regions, such as within the Brazilian Amazon. Here, we have assessed the naturally acquired humoral immune response against a recombinant PvTRAP and have investigated the associations between TRAP-specific immune responses with

the epidemiological profile of inhabitants of three municipalities in the southwestern Brazilian Amazon. We additionally searched for linear B-cell epitopes in the entire PvTRAP sequence and associated the immune response against epitopes and the recombinant protein.

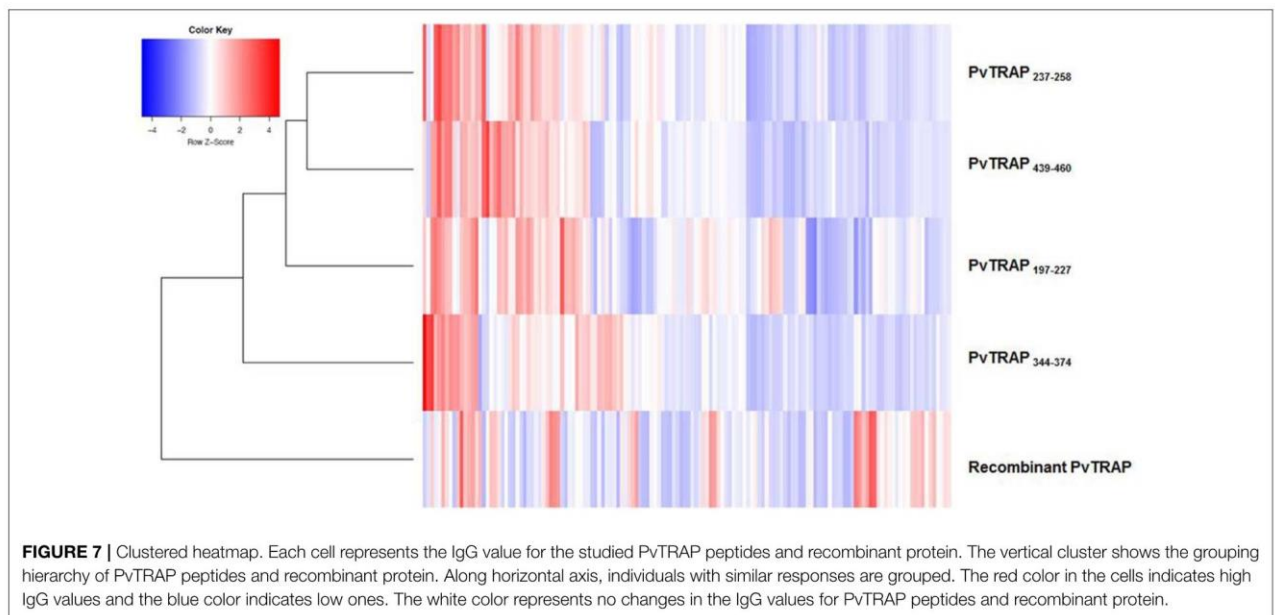
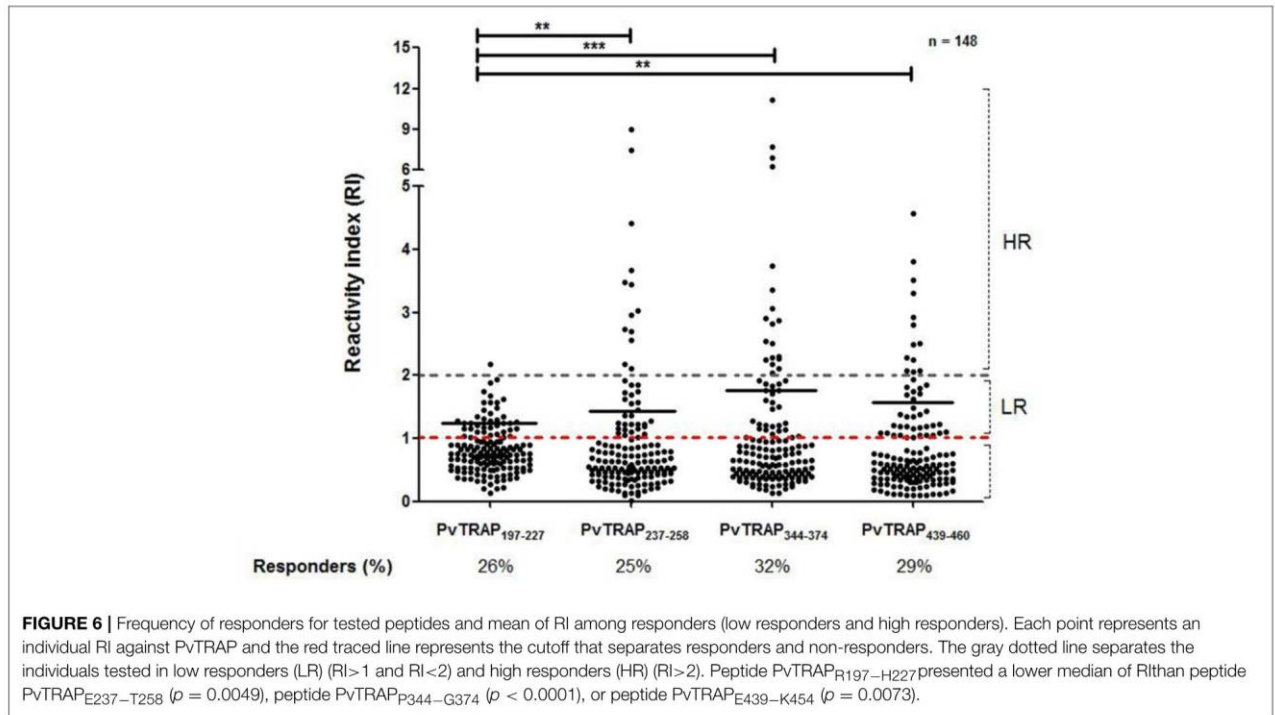
The profile of studied individuals indicates that our population is composed of rainforest region natives and migrants from non-endemic areas of Brazil who had lived in the area for more than 10 years (92%). The majority of individuals reported a prior exposure to *P. vivax* and *P. falciparum* malaria parasites. The highly variable range of numbers of previous infections, the time of residence in endemic area, and the time elapsed since the last infection, suggest that there are differences in exposure and immunity. It is well-known that the acquisition of clinical immunity is mediated by antibodies and depends on continued exposure to the parasite (29, 30). Selection of individuals in this cohort from the Amazon was ideal to assess presence of antibodies against the PvTRAP and distinguish whether their relationship to malaria exposure and/or indicatives of protection.

Firstly, we confirmed that PvTRAP is naturally immunogenic in individuals from the Amazon, since almost half of volunteers studied presented TRAP-specific IgG antibodies with a wide range in magnitude of IgG response. Our results were similar to TRAP reactivity in South East Asia, where Kosuwin et al. found an overall 51% reactivity against PvTRAP Domain II in Thailand in exposed individuals (31), and in middle-east endemic areas, where Nazeri et al. found an immune response with related frequencies in Iran (42%), Afghanistan (38%), and Pakistan (44%) (16). The frequency of responders to PvTRAP in Brazilian endemic areas herein reported was also comparable to other *P. vivax* vaccine candidates, such as AMA-1 (32), MSP-9 (33), MSP-1 (34), and DBP (35) in Amazon regions, as well as to PfTRAP in unstable transmission endemic areas of Africa (36) and Iran (37). Despite the naturally acquired immune response against PvTRAP being confirmed in studied areas, we did not find differences in reactivity index of IgG



antibodies among exposed individuals with *P. falciparum*, *P. vivax* and negatives. As expected, such differences are most noticeable in serology against erythrocyte phase antigens, since individuals residing in the transmission areas may be constantly

receiving infectious stimuli by sporozoites that could not develop the disease but still stimulate the immune system and the production of specific antibodies. It is important to mention that recently a frequency of uninfected responders against PfCSP and



PvCSP derived antigens was also reported in Brazilian endemic areas (38).

Studies on the humoral immune responses to *P. falciparum* antigens have constantly shown that immunity to blood-stage antigens is dependent on a specific pattern of immunoglobulin subclass response. Pattern of IgG subclasses responses of IgG1 and/or IgG3 antibodies to several blood-stage antigens are

effective mediators of antibody-dependent cellular inhibition (ADCI) of malaria parasites growth *in vitro*, associated with the acquisition of clinical immunity to malaria (39–42) and with fixation and complement activation (43). In fact, the subclass-specific antibodies to *P. vivax* in the development of protective immunity is still unclear and the effect of each IgG subclass is still controversial. In our cohort, the IgG

subclass profile among responders revealed an IgG1 biased humoral response with a considerable frequency of IgG3 and IgG2 antibodies. The prevalence of cytophilic antibodies against TRAP was also observed in individuals from the Middle East. However, the high frequency of IgG2 found in our work was not observed in individuals from those studies (16). In fact, we can hypothesize that host genetics factors, such HLA polymorphisms, can affect the development of specific immune response against PvTRAP as it does against other *P. vivax* antigens (44). In addition, epidemiological and environmental factors certainly affect the immune repertoire activation, potential of recognition and magnitude of TRAP-specific antibodies in such different regions. Therefore, the parameters of exposure and/or protection available in our epidemiological survey were matched with the magnitude of IgG specific antibodies in order to allow the study of potential associations. Regarding exposure, age, and time of residence in endemic areas were correlated with magnitude of anti-PvTRAP IgG antibodies. However, since in our study the majority of individuals were born in endemic areas, age related changes in antibody responses could reflect, in fact, only the time of exposure in an endemic region. This phenomenon has been frequently reported for various antigens (45–48) and most likely could reflect exposure to the malaria parasite and possibly maturation of the immune system over time, which can culminate in protection against subsequent infections. Unfortunately, the cross-sectional design of our study limited the investigation to retrospective malaria histories reported by the volunteers, and the best approximation of an individual's protection was the time elapsed since their last recalled malaria episode. Using this approach, we observed that IgG3 responders presented a significantly longer time since the last malaria episode than IgG3 non-responders. These results could suggest a possible role of PvTRAP cytophilic antibodies in protective immunity against *P. vivax* infection. However, more prospective studies on humoral immune responses with a follow up of participants and/or biologic studies addressing the ability of these antibodies to inhibit sporozoite motility or invasion will provide more direct evidence in protective efficacy of specific PvTRAP antibodies.

Whilst there is strong evidence showing that specific antibodies are associated with cumulative exposure and protection against vivax malaria (28, 30, 49–51), the relative contribution of different regions to the molecule inducing protective antibodies is another important point to be addressed. Therefore, we also map the linear epitopes in PvTRAP using *in silico* tools and confirmed the antigenicity by ELISA in PvTRAP responders. The four linear epitopes in PvTRAP sequence were identified in different regions of protein (PvTRAP_{R197–H227} in the TSR domain; PvTRAP_{E237–T258} in a region between the repeat region and TSR domain; PvTRAP_{P344–G374} fully in the repeat region; and PvTRAP_{E439–I460} in the repeat region near to the transmembrane domain). It is important to mention that two extracellular portions of PvTRAP (Domain II and repetitive region) are crucial for initial host cell adherence and stabilization of adhesion/deadhesion during gliding mobility of sporozoites (52) and are associated with protective immunity against *P. falciparum* (50). In our work, no linear epitope was confirmed in

Domain II and the epitopes located at repetitive region presented low frequency of reactivity among responders to full-length recombinant PvTRAP. The frequencies and magnitude of antibodies against PvTRAP-derived peptides were also lower than other linear epitopes identified in sporozoite surface of *P. vivax*, such CeITOS (53) and CSP (54, 55), and merozoites (MSP9 and AMA-1) (19, 56). Indeed, despite the observation of a discrete immunodominance of PvTRAP_{P344–G374} fragment over the other peptide epitopes, the heatmap analysis and the correlation of reactivity index against recombinant protein did not show a possible relationship with epidemiological parameters related to exposure or protection. The Domain II folded region probably presents conformational epitopes, which seem to be more related with blocking activity and protective immunity, making it a more suitable candidate for vaccine development. Therefore, the functional roles of these specific antibodies need to be further investigated. Lastly, although we have found a high response against PvTRAP, we do not believe that there is a cross response between PfTRAP and PvTRAP as the amino acid sequence of these proteins has low homology and prediction of epitopes for both proteins revealed no potentially antigenic sequence shared (data not shown). In addition, the B cell epitopes confirmed in our study are not preserved following PfTRAP.

In conclusion, this study describes the naturally acquired antibody response against PvTRAP in three endemic municipalities of the Brazilian Amazon. The IgG immune response was associated with exposure and mainly mediated by cytophilic IgG1 antibodies. A significant proportion of IgG3 responders presented a higher time elapsed since the last malaria episode, which could indicate the participation of anti-PvTRAP specific antibodies in protective immune response. Lastly, beyond the validation of four linear B-cell epitopes within PvTRAP full-length sequence, the low response observed against the peptide epitopes could suggest that the functional Domain II of PvTRAP present conformational epitopes. Therefore, more studies need to be addressed to this unexplored target.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript/**Supplementary Files**.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM, JL-J, LP-R, and AR-S: conceptualization. AM, JL-J, RR, and JS-A: formal analysis. AM, IS, and RR: investigation.

AM, RR, IS, LB-C, and BB: methodology. BB, LP-R, PT, AR-S, CL-C, and RS: sampling and resources. AM, JL-J, and RR: writing—original draft. LP-R, CD-R, CL-C, AR-S, and PT: writing—review and editing.

FUNDING

This work was also funded by Brazilian National Research Council—CNPq/PAPES (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Programa de Apoio Pesquisa Estratégica em Saúde), Inovabio grant program (BIO-004-FIO-17-2-11—Bio-Manguinhos/Fiocruz), and FIOCRUZ (PAEF II, IOC-023-FIO-18-2-47).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all individuals who participated in this study for their cooperation and generous donation of

blood, which made this study possible. CD-R and JL-J received a Research Productivity Fellowship from the Brazilian National Research Council (CNPq), and CD-R and JL-J were recipients of a grant from Faperj as *Cientista do Nosso Estado* and *Jovem Cientista do Nosso Estado*, respectively.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02230/full#supplementary-material>

Figure S1 | Reactivity index (RI) of non-exposed individuals (controls), *P. vivax*, *P. falciparum*, and non-infected exposed individuals. The reactivity index presented no statistical significance among the malaria exposed groups independently of infection status. The reactivity index of non-exposed individuals was significantly lower than exposed individuals (** $p < 0.0001$), *P. falciparum* (** $p < 0.0001$), and *P. vivax* (** $p < 0.00001$).

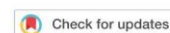
REFERENCES

- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. (2010) 4:e774. doi: 10.1371/journal.pntd.0000774
- World Health Organization. *World Malaria Report 2018* (2018).
- Muller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J*. (1993) 12:2881–9. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05950.x
- Sinnis P, Sim BK. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. *Trends Microbiol*. (1997) 5:52–8. doi: 10.1016/S0966-842X(97)84657-4
- Song G, Koksals AC, Lu C, Springer TA. Shape change in the receptor for gliding motility in *Plasmodium* sporozoites. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109:21420–5. doi: 10.1073/pnas.1218581109
- Kappe SHI, Buscaglia CA, Bergman LW, Coppens I, Nussenzweig V. Apicomplexan gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model. *Trends Parasitol*. (2004) 20:13–6. doi: 10.1016/j.pt.2003.10.011
- Chenet SM, Tapia LL, Escalante AA, Durand S, Lucas C, Bacon DJ. Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. (2012) 11:68. doi: 10.1186/1475-2875-11-68
- Atcheson E, Bauza K, Salman AM, Alves E, Blight J, Viveros-Sandoval ME, et al. Tailoring a *Plasmodium vivax* vaccine to enhance efficacy through a combination of a CSP virus-like particle and TRAP viral vectors. *Infect Immun*. (2018) 86:e00114–18. doi: 10.1128/IAI.00114-18
- Castellanos A, Arevalo-Herrera M, Restrepo N, Gulloso L, Corradin G, Herrera S. *Plasmodium vivax* thrombospondin related adhesion protein: immunogenicity and protective efficacy in rodents and Aotus monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2007) 102:411–6. doi: 10.1590/S0074-02762007005000047
- Ewer KJ, O'Hara GA, Duncan CJ, Collins KA, Sheehy SH, Reyes-Sandoval A, et al. Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nat Commun*. (2013) 4:2836. doi: 10.1038/ncomms3836
- Arevalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. *Mol Immunol*. (2001) 38:443–55. doi: 10.1016/S0161-5890(01)00080-3
- Mishra S, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Antibodies to *Plasmodium* circumsporozoite protein (CSP) inhibit sporozoite's cell traversal activity. *J Immunol Methods*. (2012) 377:47–52. doi: 10.1016/j.jim.2012.01.009
- Hollingdale MR, Zavala F, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Antibodies to the protective antigen of *Plasmodium berghei* sporozoites prevent entry into cultured cells. *J Immunol*. (1982) 128:1929–30.
- Ogwang C, Kimani D, Edwards NJ, Roberts R, Mwacharo J, Bowyer G, et al. Prime-boost vaccination with chimpanzee adenovirus and modified vaccinia Ankara encoding TRAP provides partial protection against *Plasmodium falciparum* infection in Kenyan adults. *Sci Transl Med*. (2015) 7:286re5. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2373
- Mensah VA, Gueye A, Ndiaye M, Edwards NJ, Wright D, Anagnostou NA, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of prime-boost vaccination with ChAd63 and MVA encoding ME-TRAP against *Plasmodium falciparum* infection in adults in senegal. *PLoS ONE*. (2016) 11:e0167951. doi: 10.1371/journal.pone.0167951
- Nazeri S, Zakeri S, Mehrizi AA, Djajid ND. Naturally acquired immune responses to thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) of *Plasmodium vivax* in patients from areas of unstable malaria transmission. *Acta Trop*. (2017) 173:45–54. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.05.026
- Van Regenmortel MH. Immunoinformatics may lead to a reappraisal of the nature of B cell epitopes and of the feasibility of synthetic peptide vaccines. *J Mol Recognit*. (2006) 19:183–7. doi: 10.1002/jmr.768
- Dudek NL, Perlmutter P, Aguilar MI, Croft NP, Purcell AW. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr Pharm Des*. (2010) 16:3149–57. doi: 10.2174/138161210793292447
- Rodrigues-da-Silva RN, Martins da Silva JH, Singh B, Jiang J, Meyer EV, Santos F, et al. *In silico* identification and validation of a linear and naturally immunogenic B-cell epitope of the *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidate merozoite surface protein-9. *PLoS ONE*. (2016) 11:e0146951. doi: 10.1371/journal.pone.0146951
- Aricescu AR, Lu W, Jones EY. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallograph Sec D*. (2006) 62:1243–50. doi: 10.1107/S0907444906029799
- Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. (2006) 2:2. doi: 10.1186/1745-7580-2-2
- Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. (2007) 8:4. doi: 10.1186/1471-2105-8-4
- Gausepohl H, Boulin C, Kraft M, Frank R. Automated multiple peptide synthesis. *Pept Res*. (1992) 5:315–20.
- Oksanen J, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, O'Hara R, Simpson G, et al. *Vegan: Community Ecology Package*. Oulu: R Package Version 1.17–11. 2011 (2010).
- Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Liaw WHA, Lumley T, et al. *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. R Package Version 2.17.0. Pittsford, NY: Computer software (2015).
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing (2018).

27. Dolo A, Modiano D, Doumbo O, Bosman A, Sidibe T, Keita MM, et al. Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. *Parasitologia*. (1999) 41:425–8.
28. França CT, White MT, He WQ, Hostetler JB, Brewster J, Frato G, et al. Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. *eLife*. (2017) 6:e28673. doi: 10.7554/eLife.28673
29. Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJF, Morais CG, Martins MS, et al. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg*. (2002) 66:461–6. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.461
30. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*. (2009) 22:13–36. doi: 10.1128/CMR.0025-08
31. Kosuwin R, Feng M, Makiuchi T, Putaporntip C, Tachibana H, Jongwutiwes S. Naturally acquired IgG antibodies to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP) in Thailand predominantly elicit immunological cross-reactivity. *Trop Med Int Health*. (2018) 23:923–33. doi: 10.1111/tmi.13083
32. Sanchez-Arcila JC, de Franca MM, Pereira VA, Vasconcelos MP, Teva A, Perce-da-Silva Dde S, et al. The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax*-specific antibody responses to MSP-119 and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon. *Malar J*. (2015) 14:442. doi: 10.1186/s12936-015-0978-7
33. Lima-Junior J, Tran T, Meyer E, Singh B, De-Simone SG, Santos F, et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. *Vaccine*. (2008) 26:6645–54. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.029
34. Riccio EKP, Totino PRR, Pratt-Riccio LR, Ennes-Vidal V, Soares IS, Rodrigues MM, et al. Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-119 malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. *Malar J*. (2013) 12:326. doi: 10.1186/1475-2875-12-326
35. Kano FS, Sanchez BAM, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. (2012) 17:989–1000. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x
36. Noland GS, Hendel-Paterson B, Min XM, Moormann AM, Vulule JM, Narum DL, et al. Low prevalence of antibodies to preerythrocytic but not blood-stage *Plasmodium falciparum* antigens in an area of unstable malaria transmission compared to prevalence in an area of stable malaria transmission. *Infect Immun*. (2008) 76:5721–8. doi: 10.1128/IAI.00591-08
37. Pirahmadi S, Zakeri S, Mehrizi AA, Karimi L, Djavid ND. Heterogeneity in the acquisition of naturally acquired antibodies to cell-traversal protein for ookinets and sporozoites (CelTOS) and thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* in naturally infected patients from unstable malaria areas in Iran. *Acta Trop*. (2019) 190:365–74. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.12.014
38. Pereira VA, Sánchez-Arcila JC, Vasconcelos MPA, Ferreira AR, de Souza Videira L, Teva A, et al. Evaluating seroprevalence to circumsporozoite protein to estimate exposure to three species of Plasmodium in the Brazilian Amazon. *Infect Dis Poverty*. (2018) 7:46. doi: 10.1186/s40249-018-0428-1
39. Metzger WG, Okenu DM, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol*. (2003) 25:307–12. doi: 10.1046/j.1365-3024.2003.00636.x
40. Bouharoun-Tayoun H, Ouevray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. (1995) 182:409–18. doi: 10.1084/jem.182.2.409
41. Cavanagh DR, Dobano C, Elhassan IM, Marsh K, Elhassan A, Hviid L, et al. Differential patterns of human immunoglobulin G subclass responses to distinct regions of a single protein, the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. (2001) 69:1207–11. doi: 10.1128/IAI.69.2.1207-1211.2001
42. Topolska AE, Richie TL, Nhan DH, Coppel RL. Associations between responses to the rhoptry-associated membrane antigen of *Plasmodium falciparum* and immunity to malaria infection. *Infect Immun*. (2004) 72:3325–30. doi: 10.1128/IAI.72.6.3325-3330.2004
43. Kurtovic L, Behet MC, Feng G, Reiling L, Chelimo K, Dent AE, et al. Human antibodies activate complement against *Plasmodium falciparum* sporozoites, and are associated with protection against malaria in children. *BMC Med*. (2018) 16:61. doi: 10.1186/s12916-018-1054-2
44. Lima-Junior JdC, Pratt-Riccio LR. Major histocompatibility complex and malaria: focus on *Plasmodium vivax* infection. *Front Immunol*. (2016) 7:13. doi: 10.3389/fimmu.2016.00013
45. Pratt-Riccio LR, Lima-Junior JC, Carvalho LJ, Theisen M, Espindola-Mendes EC, Santos F, et al. Antibody response profiles induced by *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein in naturally exposed individuals from a Brazilian area endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg*. (2005) 73:1096–103. doi: 10.4269/ajtmh.2005.73.1096
46. Tran TM, Oliveira-Ferreira J, Moreno A, Santos F, Yazdani SS, Chitnis CE, et al. Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. *Am J Trop Med Hyg*. (2005) 73:244–55. doi: 10.4269/ajtmh.2005.73.244
47. Baird JK. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol*. (1998) 92:367–90. doi: 10.1080/00034989859366
48. Ceravolo IP, Bruna-Romero O, Braga EM, Fontes CJ, Brito CF, Souza JM, et al. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. (2005) 72:675–81. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.675
49. Noland GS, Jansen P, Vulule JM, Park GS, Ondigo BN, Kazura JW, et al. Effect of transmission intensity and age on subclass antibody responses to *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic and blood-stage antigens. *Acta Trop*. (2015) 142:47–56. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.10.011
50. Scarselli E, Tolle R, Koita O, Diallo M, Müller HM, Früh K, et al. Analysis of the human antibody response to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. (1993) 61:3490–5.
51. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*. (2008) 9:725–32. doi: 10.1038/ni.f.205
52. Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, et al. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J*. (1999) 18:5195–204. doi: 10.1093/emboj/18.19.5195
53. Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Lopez-Camacho C, Martins da Silva JH, Perce-da-Silva DS, Teva A, et al. *Plasmodium vivax* cell-traversal protein for ookinets and sporozoites: naturally acquired humoral immune response and B-Cell epitope mapping in Brazilian Amazon inhabitants. *Front Immunol*. (2017) 8:77. doi: 10.3389/fimmu.2017.00077
54. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Valencia AZ, Cifuentes C, Hurtado S, et al. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Int J Parasitol*. (2004) 34:1535–46. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.10.009
55. Herrera S, Fernandez OL, Vera O, Cardenas W, Ramirez O, Palacios R, et al. Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. *Am J Trop Med Hyg*. (2011) 84(Suppl. 2):12–20. doi: 10.4269/ajtmh.2011.09-0516
56. Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourao LC, de Avila RA, Soares IS, et al. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS ONE*. (2011) 6:e21289. doi: 10.1371/journal.pone.0021289

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Matos, Rodrigues-da-Silva, Soares, Baptista, Souza, Bitencourt-Chaves, Totino, Sánchez-Arcila, Daniel-Ribeiro, López-Camacho, Reyes-Sandoval, Pratt-Riccio and Lima-Junior. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



OPEN **Recombinant *Plasmodium vivax* circumsporozoite surface protein allelic variants: antibody recognition by individuals from three communities in the Brazilian Amazon**

Isabela Ferreira Soares^{1,7}, César López-Camacho^{2,7}, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva^{3,7}, Ada da Silva Matos¹, Barbara de Oliveira Baptista⁴, Paulo Renato Rivas Totino⁴, Rodrigo Medeiros de Souza⁵, Kate Harrison², Alba Marina Gimenez², Elisângela Oliveira de Freitas², Young Chan Kim^{3,2}, Joseli Oliveira-Ferreira¹, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro^{4,6}, Arturo Reyes-Sandoval^{3,2}, Lilian Rose Pratt-Riccio⁴ & Josué da Costa Lima-Junior¹✉

Circumsporozoite protein (CSP) variants of *P. vivax*, besides having variations in the protein repetitive portion, can differ from each other in aspects such as geographical distribution, intensity of transmission, vectorial competence and immune response. Such aspects must be considered to *P. vivax* vaccine development. Therefore, we evaluated the immunogenicity of novel recombinant proteins corresponding to each of the three *P. vivax* allelic variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) and of the C-terminal region (shared by all PvCSP variants) in naturally malaria-exposed populations of Brazilian Amazon. Our results demonstrated that PvCSP-VK210 was the major target of humoral immune response in studied population, presenting higher frequency and magnitude of IgG response. The IgG subclass profile showed a prevalence of cytophilic antibodies (IgG1 and IgG3), that seem to have an essential role in protective immune response. Differently of PvCSP allelic variants, antibodies elicited against C-terminal region of protein did not correlate with epidemiological parameters, bringing additional evidence that humoral response against this protein region is not essential to protective immunity. Taken together, these findings increase the knowledge on serological response to distinct PvCSP allelic variants and may contribute to the development of a global and effective *P. vivax* vaccine.

Plasmodium, a complex multi-stage organism, has specialized proteins that promote the parasite's survival in both vertebrate and invertebrate hosts and support the invasion of multiple cell types. Vaccines targeting sporozoites correspond to an attractive strategy widely explored since fewer than 100 sporozoites are inoculated in human

¹Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Nuffield Department of Medicine, The Jenner Institute, The Henry Wellcome Building for Molecular Physiology, University of Oxford, Oxford, UK. ³Laboratório de Tecnologia em Anticorpos Monoclonais, Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Laboratório de Pesquisa em Malária, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro Multidisciplinar, Campus Floresta, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Brazil. ⁶Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁷These authors contributed equally: Isabela Ferreira Soares, César López-Camacho and Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva. ✉email: josue@ioc.fiocruz.br

host during the blood meal of infected female *Anopheles* mosquito¹. Moreover, it was already demonstrated that in mice², non-human primates^{1,2} and humans³, the immunization using irradiated sporozoites is capable to elicit protective immunity.

Despite the broad investigation of various proteins as vaccine candidates, the circumsporozoite surface protein (CSP) remains in the lead because it was described as sporozoites' major surface protein and it has a crucial role in sporozoite's motility and hepatocyte invasion^{4,5}. It has been reported that the CSP play a vital role in invading to the mosquito's salivary glands, binding sporozoite to liver cells, and inactivating the host cell protein synthesis machinery⁶. It has already been demonstrated that specific antibodies against the *P. falciparum* circumsporozoite protein (PfCSP), present in the serum of vaccinated mice, rhesus macaques and humans, have the ability to block sporozoite invasion of hepatocytes⁷. Structurally, CSP contains approximately 400 amino acids and is organized into three domains: the N-terminal, which contains the conserved pentapeptide (region I); a highly repetitive species-specific central domain (repetitive region) and a conserved C-terminal domain (region II).

Currently, the most advanced malaria vaccine is the RTS,S, manufactured by GlaxoSmithKline (GSK). RTS,S, produced in *Saccharomyces cerevisiae*, consists in a recombinant vaccine comprising PfCSP's C-terminal and repeat regions in combination with hepatitis B virus' surface antigen (S)⁸. It is already licensed vaccine is being implemented since 2018 in selected areas of Ghana, Kenya and Malawi^{9,10}. On the other hand, such as almost all vaccine candidates currently tested, this vaccine targets only *P. falciparum*. The priority given to falciparum malaria results from the ability of this plasmodial species in producing elevated parasite loads and to invade red blood cells in all stages, causing extensive morbidity and mortality¹¹. Nevertheless, some particularities of *P. vivax*, such as the increasing numbers of reports of severe vivax malaria^{12–15} and the appearance of strains resistant to treatment^{16–18}, highlight the importance of the development of a specific vaccine against *P. vivax*.

In contrast to PfCSP, *P. vivax* CSP (PvCSP) is polymorphic and has three allelic variants. Analyses in PvCSP genotypes demonstrated the existence of sequence repeats of this protein belonging to one of two types of nonapeptide repeat units known as VK210 (GDRA(A/D)GQPA) and VK247 (ANGA(G/D)(N/D)QPG)^{19,20}. In addition, a third variant, identified by Qary et al.²¹ as *P. vivax*-like, is different from both nonapeptide variants, and it is composed by a repeat sequence of 11-mer-APGANQ(E/G)GGAA-. Phylogenetic and serological study conducted by Souza-Neiras et al.²², has demonstrated that differences in these three variants are strictly present in the central repeats of the protein, but present several nucleotide variations with important serological impact. Therefore, it should be considered for PvCSP vaccine trials once they represent important intra-specific biological signatures. In Brazil, the prevalence of PvCSP allelic variants was previously studied and is known in several states such as Acre, Amazonas, Belém, Macapá, Mato Grosso, Pará, Porto Velho and Rondônia^{23,24}.

Although less investigated than PfCSP, *P. vivax* CSP began to receive more attention in recent years and strategies were developed to overcome the variations in central domain. An example is the *Escherichia coli* expressed vaccine VMP001, which encodes a chimeric CSP and contains sequences with repetitions of alleles VK210 and VK247. This vaccine went into clinical testing and was capable of inducing recognition, agglutination and virulence loss of live sporozoites, due to the high levels of antibodies induced²⁵. Salman et al. also reported the deployment of a highly protective *P. vivax* vaccine, composed by Salvador I sequences of CSP, including its C-terminal region and central repeats of VK210 and VK247, on the surface of a virus-like particle (VLP) based on the Hepatitis B surface antigen, overall known as Rv21. This vaccine was used in rodent model challenges with transgenic sporozoites, where it was capable to achieve 100% sterile protection²⁶. In the present study, the naturally acquired humoral immune response to PvCSP repeat variants was evaluated in exposed populations of three regions in the Brazilian Amazon, using recombinant proteins for each one of the three alleles already described. We have also determined the antibody subclass profile induced by different PvCSP variants and verified the associations between the specific IgG and its subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) with epidemiological characteristics that can suggest exposition and/or protection indicators in exposed populations.

Results

Epidemiological profile of the studied population. 299 individuals living in three different endemic areas of Brazilian Amazon composed our study population (Cruzeiro do Sul, Guajará and Mâncio Lima). The population age ranged from 12 to 88 years old (median 32 years) and presented similar frequencies of female and male individuals. Studied individuals have been naturally exposed to malaria infection, have been living in endemic areas for 31 years (ranging from 3 to 88 years), most frequently in the same address (0 to 88 years, median 20 years) and reporting, for 86% of the population, at least one previous malaria episode. *P. vivax* was the most prevalent species, together this species mono-infections and mixed infections corresponded to 65.2% of cases diagnosed during the period of study ($p < 0.0001$), and to the leading cause of previous malaria episodes in 81% of studied individuals. The control group composed by 53 individuals from the non-endemic area of Rio de Janeiro, who never reported malaria episodes, was composed by 69.8% female and 30.2% male, ranging from 17 to 43 years old (median 20 years). The analysis of individual populations based on localities studied (Table 1) reveals a similar profile in relation to time of exposure, number of past malaria infections and diagnosis at the time of blood collection. However, volunteers residing in Guajará (GJ) presented longer time since the last malaria episode (median 12 months) than those of Cruzeiro do Sul (median 2.5 months) and Mâncio Lima (median 3.5 months; $p = 0.0044$ and 0.0001 , respectively).

Design of the vCSP proteins and assessment of protein secretion for purification. Serological analysis of the immune response to malarial antigens is paramount to establish the immunogenicity of potential vaccine candidates and the immune competence or even the effect of parasite genetic polymorphisms in the immunity of residing populations in a given geographical location. However, most of the studies conduct ELISAs against the full-length protein of interest. Here we sought to dissect the serological immune responses

Epidemiological features	CZS ^a	GJ ^b	ML ^c	Total
	(n = 124)	(n = 87)	(n = 88)	(n = 299)
Gender—N (%)				
Male	65 (52.4%)	45 (51.7%)	44 (50%)	154 (51.5%)
Female	59 (47.6%)	42 (48.3%)	44 (50%)	145 (48.5%)
Malaria exposure—median (IR)				
A.P.I	55,5	42,5	107,2	61,4
Age (years)	29.5 (20–45)	33 (22–50)	33.5 (23–42.5)	32 (22–47)
Years of residence on endemic area	29 (19.5–44)	33.5 (23–50)	32.5 (21–43)	31 (21–47)
Years of residence in the present address	20 (6–36)	18 (3–29) ^{c*}	27.5 (12.5–38.5) ^{b*}	20 (5–36)
Months since the last malaria episode	2.5 (0–60) ^{b**}	12 (4–48) ^{***c***}	3.5 (0–22) ^{b***}	5 (0–36)
Number of malaria episodes on the last year	1 (0–1)	0 (0–1)	1 (0–1.5)	0.5 (0–1)
Number of previous malaria episodes	6 (2–12)	5 (2–10)	10 (5–20)	7 (3–15)
Species causing previous episodes—N (%)				
<i>P. vivax</i>	23 (19%)	16 (18%)	17 (19%)	56 (19%)
<i>P. falciparum</i>	10 (8%)	6 (7%)	0 (0%)	16 (5%)
<i>P. vivax and P. falciparum</i>	68 (55%)	51 (59%)	67 (76%)	186 (62%)
Never infected	1 (0.8%)	6 (7%)	0 (0%)	7 (2%)
Not reported	21 (17%)	8 (9%)	5 (6%)	34 (11%)
Diagnosis—N (%)				
<i>P. vivax</i>	39 (31.5%)	10 (11.5%)	24 (27.3%)	73 (24.4%)
<i>P. falciparum</i>	25 (20.2%)	6 (6.9%)	10 (11.4%)	41 (13.7%)
Mixed	0 (0%)	1 (1.1%)	3 (3.4%)	4 (1.3%)
Negative	60 (48.4%) ^{b**}	70 (80.5%) ^{***c**}	51 (58%) ^{b**}	181 (60.5%)

Table 1. Epidemiological features of the study population. Values of A.P.I. (annual parasitic index), Age, Years of residence in endemic areas, Years of residence in the present address, Months since the last malaria, Number of malaria episodes on the last year and number of previous malaria episodes represent the median (interquartile range). Frequencies were compared by Fisher's test, and other epidemiological parameters were compared by Mann–Whitney test. Upper scripted letters (^{a,b,c}) indicate the studied populations (CZS = Cruzeiro do Sul; ML = GJ = Guajará and Mâncio Lima, respectively) and statistical differences were represented by * (*) $p < 0.05$; ***) $p < 0.005$; ****) $p < 0.0005$.

against vivax CSP malaria by constructing expression plasmids encoding the sole central repeats of each of the allelic variants of VK247, VK210 and V-Like, respectively, and the C-terminal region of CSP (Fig. 1). The design of these sub-domain regions is based in the antigenic conformation of the chimeric CSP 210/247 from the Rv21 vaccine²⁶ which also contains the highly conserved C-Terminal region of vCSP. For the case of the Vivax-Like repeats we used a sequence previously reported²⁶. Figure 1a shows a diagrammatic representation of vCSP and the four subunits that were synthesized and enzyme-digested to ligate (Fig. 1b) into the expression plasmid PhLSec. After ligation with the PhLsec backbone, bacterial transformants were double-digested to verify the right size of the transgenes (Fig. 1c). The red and black asterisks denote the specific size of each transgene and the PhLSec backbone, respectively. Upon confirmation of the right clones by enzymatic digestion, plasmids were further verified by Sanger-sequencing. PhLsec plasmids were then transfected into HEK293 cells and supernatant was recovered to assess the secretion capabilities of our c-tagged vCSP subunits. Supernatants were subjected to western blot analysis using a camelid anti-C-Tag antibody (Fig. 1d). Specific bands were detected for the C-term, VK247 and Vivax-Like as well as in the unrelated NS1 beta ladder protein fused to EPEA (c-tag). No bands were detected in the negative untransfected cells or in the unrelated PhLsec plasmid fused to His-tag. However, the anti-C-Tag antibody failed to recognize the VK210 repeats, suggesting a masking effect inflicted by the protein-resolving conditions. To further investigate this masking effect, we used specific monoclonal antibodies (mAb) targeting the VK210 (Fig. 1e) and the VK247 (Fig. 1f) repeats, respectively. By using the anti-210 mAb, we detected a strong signal in the sample that was negative in the C-tag western blot, and not in the other transfectant supernatants, thus confirming the secretion capabilities of VK210 repeats (Fig. 1e). On the other hand, when using the anti-247 antibody, we detected abundant signal in the lane corresponding to the VK247 supernatants, thus confirming the secretion of the VK247 repeats (Fig. 1f). A non-specific band of 35 Kda was detected in all samples. Therefore, the design of the expression plasmids allows the expression and the secretion of the vCSP subunits for a subsequent protein-column purification, to be used as coating agents in the ELISA assays.

Frequency and magnitude of IgG antibodies to recombinant proteins derived from PvCSP. We assessed the naturally acquired IgG response against PvCSP recombinant central repeats of PvCSP-VK210, PvCSP-VK247, and PvCSP-*P. vivax*-like, as well as the PvCSP-C terminal region, in 299 exposed individuals.

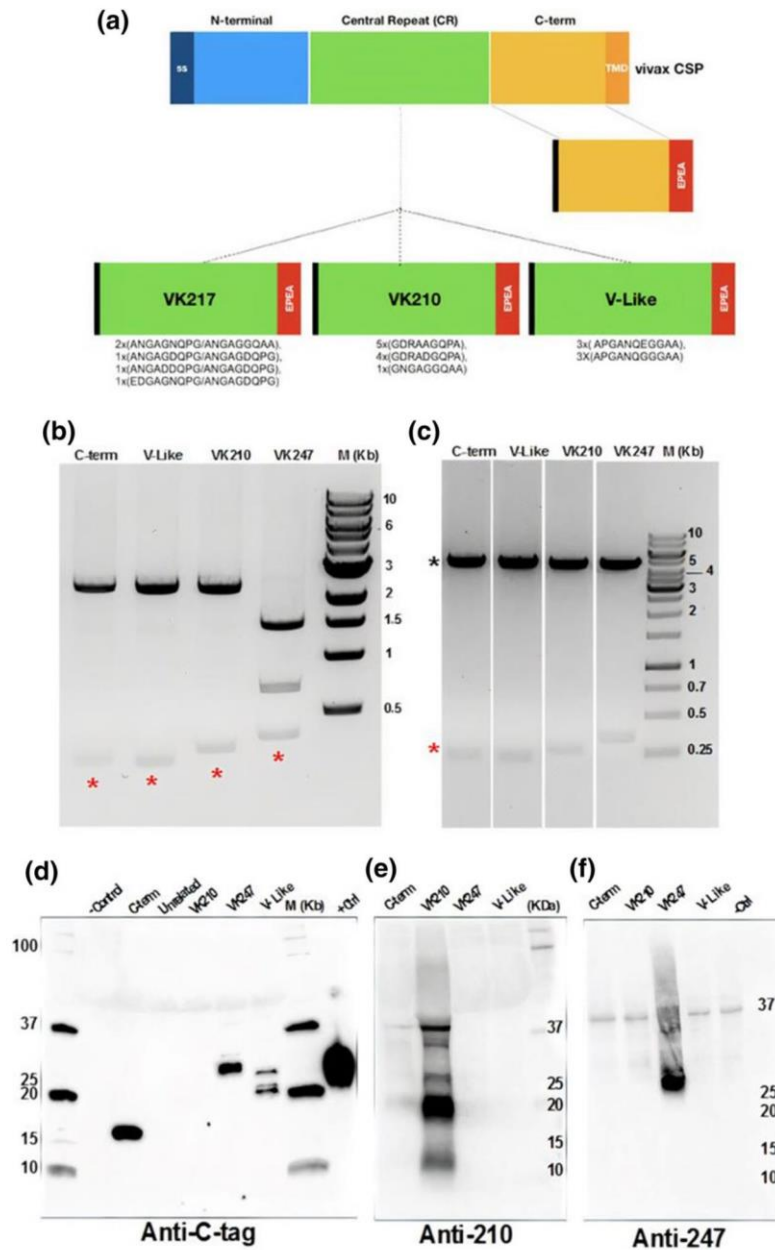


Figure 1. Expression of vCSP malarial antigens for protein production. (a) Schematic representation of the vivax CSP protein. The C-term portion (yellow) without its transmembrane domain, as well as the 3 different allelic variants from the central repeat region (VK217, VK247 and V-like) were fused to the c-tag epitope (EPEA) to allow purification using a c-tag affinity column (red). Black color represents the exogenous signal sequence contained in the expression plasmid construct. (b) Synthetic DNA sequences carrying such malarial antigens were extracted by double enzymatic digestion (AgeI and KpnI), red asterisk represents the specific size for each construct that were cut from the agarose gel, followed by ligation to the backbone plasmid pHLsec. (c) Enzymatic restriction from the PhLsec plasmids after ligation with the malarial antigens. Red asterisk represents the specific size of the coding regions and black asterisk represents the PhLsec backbone/PhLsec plasmid were transfected into HEK293 cells and supernatant was recovered 4 days after transfection. 10 ml of each of the supernatants was subjected to SDS-PAGE and western blot against the anti-C-Tag (d), the anti-210 (e), and the anti-247 (f) antibodies.

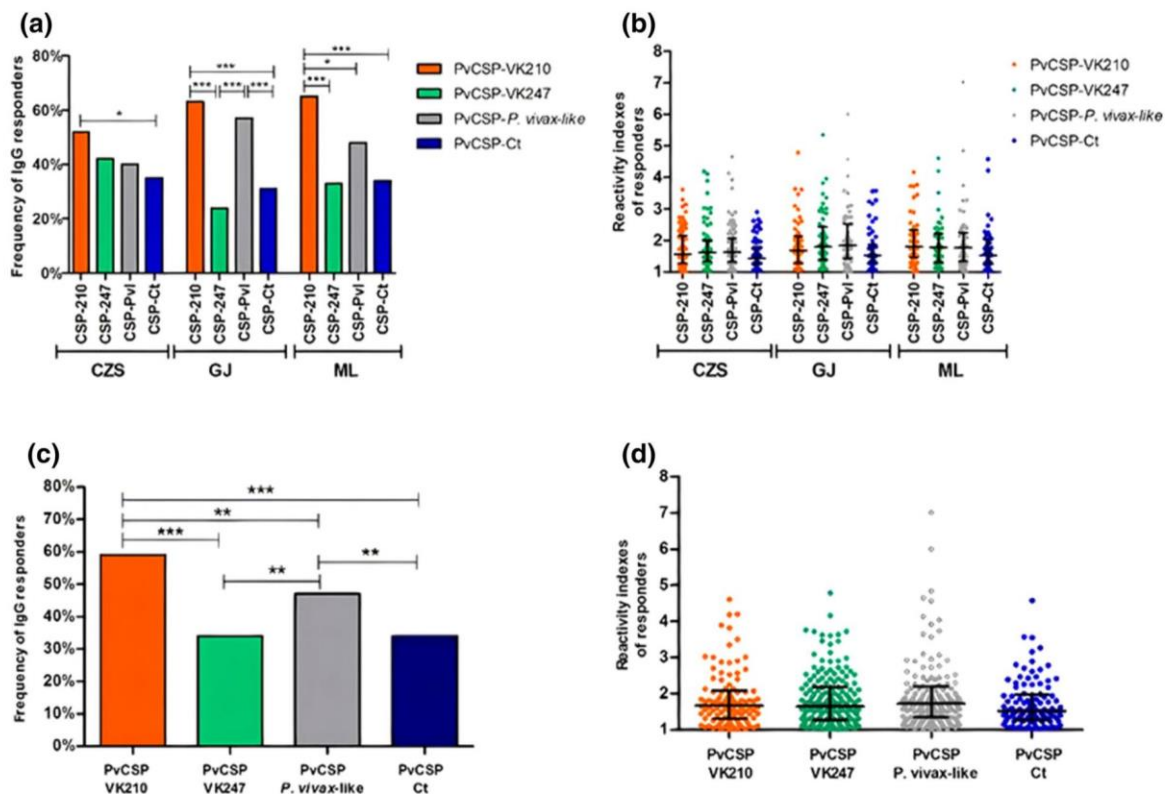


Figure 2. Humoral response against PvCSP recombinant proteins. Frequencies of IgG responders in each studied locality (a); reactivity indexes of responders in the three studied localities (b); overall frequencies of IgG responders (c) and overall reactivity indexes of IgG antibodies of responders (d) to each recombinant protein derived from PvCSP. In (a) and (c), each bar represents the frequency of responders to one of the recombinant proteins (PvCSP-VK210: orange bar; PvCSP-VK247: green bar; PvCSP-*P. vivax*-like: gray bar and PvCSP-Ct: purple bar). Figure 1b,d, each point represents an individual RI against PvCSP recombinant proteins (PvCSP-VK210: orange points; PvCSP-VK247: green points; PvCSP-*P. vivax*-like: gray points and PvCSP-Ct: purple points). Black bars on (b) and (d) represent values of median and interquartile range. RIs higher than 1 are considered responders to the recombinant protein. Frequencies of responders were compared by Fisher's exact test and RIs were compared by Mann-Whitney test. Significant differences were indicated by *. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.005$; (***) $p < 0.0005$.

Firstly, we evaluated the frequency of responders to recombinant PvCSPs in each studied community (Fig. 2a). In Cruzeiro do Sul (CZS), the frequencies of responders to PvCSP allelic variants (PvCSP-VK210, PvCSP-VK247, PvCSP-*P. vivax*-like) were quite similar (52%, 42% and 40%, respectively), while in Guajará (GJ) we observed higher frequencies of responders to PvCSP-VK210 (63%) and PvCSP-*P. vivax*-like (57%) than frequencies of responders to PvCSP-VK247 (24%) ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively) and to PvCSP-Ct (31%) ($p < 0.0001$ and $p = 0.0007$, respectively). Moreover, in Mâncio Lima community (ML), we observed a prevalence of responders to PvCSP-VK210 (65%) when compared to frequency of responders to PvCSP-VK247 (33%, $p < 0.0001$), PvCSP-*P. vivax*-like (48%, $p = 0.0331$) and to PvCSP-Ct (34%, $p < 0.0001$). In relation to the magnitude of response to different recombinant PvCSP among responders, despite differences in epidemiological data and frequencies of responders in each studied location, similar IgG reactivity indexes against PvCSP variants and PvCSP-Ct were observed in all studied populations (Fig. 2b). Based on the absence of statistical differences among IgG reactivity indexes against recombinant proteins in these three studied places, we decided to analyze them as a single population. Responders to PvCSP-VK210 ($n = 177$; 59%) were more prevalent when compared to responders to PvCSP-VK247 ($n = 102$, 34%; $p < 0.0001$), to PvCSP-*P. vivax*-like ($n = 141$, 47%; $p = 0.0041$) and to PvCSP-Ct ($n = 101$, 34%; $p < 0.0001$), followed by responders to PvCSP-*P. vivax*-like, which were more prevalent than those responding to PvCSP-VK247 ($p = 0.0015$) and to PvCSP-Ct ($p = 0.0011$) (Fig. 2c). Despite differences observed in frequencies of IgG responders, the magnitude of IgG responses was similar among responders to PvCSP recombinant proteins. The average RI of responders against PvCSP-VK210 (1.84 ± 0.72), PvCSP-VK247 (1.86 ± 0.77), PvCSP-*P. vivax*-like (1.96 ± 0.95) and PvCSP-Ct (1.74 ± 0.65) did not differ statistically ($p > 0.05$) (Fig. 2d). All samples from healthy Control group were negative to all four recombinant proteins.

Two hundred and seven of individuals (69%) presented IgG antibodies against at least one of recombinant proteins, from these 92% (190) have reported previous *P. vivax* infections, including ongoing infections 23,7%

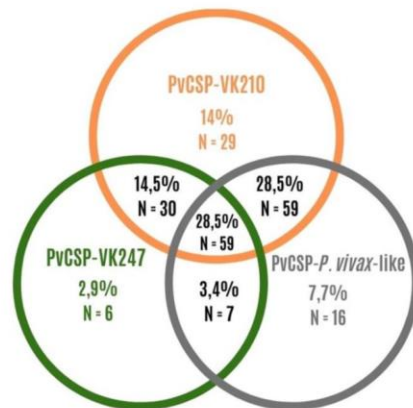


Figure 3. Venn diagram of responders to at least one of the recombinant proteins. In this diagram, values of N and the percentage of responders are demonstrated. Values marked with colors represent individuals that respond exclusively to the indicated protein (orange PvCSP-VK210, green PvCSP-VK247 and gray PvCSP-P. vivax-like). Values in black represent individuals that respond to two or three of the recombinant proteins according to the circles in which values are inserted.

(49). Only 17 individuals never reported previous *P. vivax* episodes and 4 of these (2%) were infected with *P. falciparum*. Among responders, 16.9% of individuals presented antibodies against all four recombinant proteins, 37.7% against three recombinant proteins, 25.6% to two of the recombinant proteins and 19.8% to only one antigen. Inside the group of responders to only one recombinant protein ($n = 41$), PvCSP-VK210 represented 56.1%. Moreover, focusing on humoral immune response to PvCSP variants, 28.5% of responders to at least one of recombinant proteins, responds to the three PvCSP-variants, 14.5% to PvCSP-VK210 and PvCSP-VK247, 28.5% to PvCSP-VK210 and PvCSP-P. vivax-like, 3.4% to PvCSP-VK247 and PvCSP-P. vivax-like, 14% responds only to PvCSP-VK210, 2.9% only to PvCSP-VK247 and 7.7% only to PvCSP-P. vivax-like, as demonstrated in Fig/3.

In order to evaluate if the infection status could change the antibody profile of recognition, we also assessed the frequency and magnitude of antibodies against the recombinants by the presence/absence of *P. vivax* at the time of blood collection. Among individuals living in endemic areas, 31% ($n = 92$) did not present antibodies to any of the recombinant proteins, these individuals include 28 infected *P. vivax* individuals. We have also selected *P. vivax* infected and non-infected individuals inside the group of 207 recombinant protein responders and compared their frequencies and IgG reactivity indexes. We found out higher frequencies of IgG responders to PvCSP-VK210 and PvCSP-Ct in non-infected individuals ($p = 0.0086$ and $p = 0.0117$, respectively). However, IgG magnitude was similar between these two groups (supplementary figure/S1).

Evaluation of IgG subclass profile against PvCSP variants. We assessed the overall subclass distribution of the IgG antibody (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) responses among responders to each recombinant protein. Among 177 responders to PvCSP-VK210, 149 individuals (84.2%) presented IgG1 antibodies. It is higher than the frequencies of IgG2 (67.8%, $p = 0.0005$), IgG3 (43.5%, $p < 0.0001$) and IgG4 (5.6%, $p < 0.0001$). Similarly, responders to PvCSP-VK247 ($n = 102$), also had a prevalence of IgG1 (70.6%) over the other IgG subclasses ($p < 0.0001$), followed by IgG2 (33.3%) and similar frequencies of IgG3 (13.7%) and IgG4 (17.6%) ($p = 0.0015$ and $p = 0.0155$, respectively, when compared to IgG2 responders). In contrast, among responders to PvCSP-P. vivax-like ($n = 141$), IgG3 was the most frequent subclass, representing 76.6% of responders ($p < 0.0001$ as compared to other subclasses), while 33.3%, 19% ($p = 0.0063$) and 25.5% of this group presented IgG1, IgG2 and IgG4 specific antibodies respectively. Lastly, among responders to the C-terminal region of PvCSP (PvCSP-Ct, $n = 101$), we observed a minor frequency of responders to IgG4 (7.9%) than to all other subclasses ($p < 0.0001$). Moreover, similar frequencies of responders to IgG3 (58.4%) and IgG2 (47.5%) were observed, both of them, higher than the observed frequency of responders to IgG1 (25.7%) ($p < 0.0001$ and $p = 0.0021$, respectively) (Fig/4a).

Concerning the magnitude of response of each IgG subclass against PvCSP, the RIs ranged from 0.15 to 34.32. Focusing on subclasses profile against PvCSP-VK210, IgG1 responders presented higher RIs (median = 2.97; interquartile range = 1.86–4.83) than IgG2 (median = 1.86; interquartile range = 1.39–2.93, $p < 0.0001$), IgG3 (median = 1.2; interquartile range = 1.1–1.6, $p < 0.0001$) and IgG4 responders (median = 1.39; interquartile range = 1.07–1.79, $p = 0.0002$), while responders to IgG3 and to IgG4 presented similar RI and both subclasses had lower RIs than IgG2 ($p < 0.0001$ and 0.018, respectively). Moreover, despite the high prevalence of IgG1 responders against PvCSP-VK247, the RIs of IgG1 responders (median = 1.43; interquartile range = 1.2–2.28) were only higher than IgG2 (median = 1.28; interquartile range = 1.07–1.66; $p = 0.0359$) and IgG4 (median = 1.23; interquartile range = 1.08–1.69; $p = 0.0436$), although RIs of IgG3 responders (median = 1.2; interquartile range = 1.07–2.34) were similar to other IgG subclasses. Besides, concerning the reactivity to PvCSP-P. vivax-like, the RIs of IgG3 responders (median = 1.76; interquartile range = 1.31–2.38) were higher than that of IgG1 (median = 1.15; interquartile range = 1.09–1.3, $p < 0.0001$), of IgG2 (median = 1.04; interquartile range = 1.02–1.15, $p < 0.0001$) and of IgG4 (median = 1.23; interquartile range = 1.05–1.54, $p < 0.0002$). Finally, considering the responsiveness to

PvCSP-C-terminal region, we observed no differences among the RIs of responders to IgG1 (median = 1.16; interquartile range = 1.08–1.39); IgG2 (median = 1.29; interquartile range = 1.12–1.82); IgG3 (median = 1.15; interquartile range = 1.06–1.25) and IgG4 (median = 1.18; interquartile range = 1.06–1.73).

Furthermore, a higher IgG1 RI response against PvCSP-VK210 was observed when compared to RI of IgG1 against PvCSP-VK247 ($p < 0.0001$) and to PvCSP-*P. vivax*-like ($p < 0.0001$), and a higher IgG3 reactivity to PvCSP-*P. vivax*-like than to PvCSP-VK210 ($p < 0.0001$) (Fig. 4b). When we selected and compared infected and non-infected responders to each subclass per recombinant protein we did not find differences in frequencies and reactivity indexes (supplementary figure S1).

Evaluation of associations between exposition/protection factors and humoral immune response to PvCSP.

In order to investigate the influence of epidemiological parameters on the responsiveness to PvCSP, we compared the epidemiological data of responders and non-responders to each one of the PvCSP recombinant proteins. Responders to PvCSP-VK210, VK247 and *P. vivax*-like presented higher median of age ($p = 0.007$; $p = 0.003$; $p = 0.007$, respectively) and time of residence in endemic area ($p = 0.005$; $p = 0.005$ and $p = 0.015$, respectively) than non-responders to each protein. No statistical difference was found between responders and non-responders to PvCSP-Ct (Fig. 5a–d).

To identify factors associated with the magnitude of response to each antigen, we investigated the existence of correlations between RIs against recombinant proteins and epidemiological data. Firstly, we observed a tendency of correlation between age and time of residence on endemic area with RIs of IgG antibodies against PvCSP-VK210 ($p = 0.007$, $r = 0.159$ and $p = 0.005$, $r = 0.165$; respectively) and against PvCSP-*P. vivax*-like ($p = 0.026$, $r = 0.131$ and $p = 0.037$, $r = 0.124$; respectively). In addition, RIs of IgG antibodies against PvCSP-VK247 presented a tendency of correlation with the number of previous malaria episodes (NPME) ($p = 0.024$, $r = 0.135$).

Besides, searching for associations between subclass profile against PvCSP-variants and epidemiological data, we identified that the number of previous malaria episodes positively correlated with the IgG1 levels to PvCSP-VK210 ($p = 0.008$, $r = 0.204$) and IgG3 levels to PvCSP-VK247 ($p = 0.0007$, $r = 0.278$). For PvCSP-*P. vivax*-like responders, the RIs of IgG2 were directly correlated with both, age ($p = 0.002$, $r = 0.266$) and time of residence in endemic area ($p = 0.001$, $r = 0.294$). No significant correlations were observed between epidemiological data and humoral response to PvCSP-Ct.

Characteristics of responders to the three major PvCSP variants.

In order to investigate the effect of responsiveness against all PvCSP variants on protection against malaria, we compared the epidemiological data of responders to all three PvCSP variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like; $N = 59$) with those of individuals who did not respond to at least one of these variants ($N = 240$). Samples of responders to three variants have a significantly longer time of residence in endemic area (TREA) (median = 38; interquartile range = 24.5–52.5), on average 6 years more than individuals that did not respond (median = 30; interquartile range = 21–44) ($p = 0.017$). Moreover, the RIs of cytophilic antibodies of responders to three PvCSP variants inversely correlated with months since the last malaria (MSLM). Reactivity indexes of IgG1 against PvCSP-VK210 ($p = 0.047$; $r = -0.276$), IgG1 ($p = 0.041$; $r = -0.285$) and IgG3 ($p = 0.029$; $r = -0.303$) against PvCSP-*P. vivax*-like inversely correlated with MSLM (Fig. 6a,c,d). However, as it is shown in Fig. 6b, RIs of IgG1 against PvCSP-VK247 directly correlated with this same parameter ($p = 0.041$; $r = 0.285$).

Discussion

Previous works have proposed that CSP variants of *P. vivax*, besides having variations in the repetitive portion of the protein, can differ from each other in aspects such as geographical distribution, intensity of transmission, vectorial competence, immune response, response to treatment and drug resistance^{23,27–29}. Such aspects must be considered to *P. vivax* vaccine development²². Therefore, multidisciplinary studies characterizing PvCSP variants epidemiology may advance in the development of an effective vaccine against *P. vivax*.

In our study, we evaluated and characterized the humoral IgG response to the PvCSP variant repeats (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) and the C-terminal region, in a population consisting of 299 individuals naturally exposed to *P. vivax* malaria, living in Acre, a state of the malaria endemic Brazilian Amazon. From 207 responders to at least one of recombinant proteins, 190 described previous *P. vivax* infections and just 49 were infected with this species. This result suggests that production of antibodies against PvCSP extends for past infections. This feature was previously demonstrated in a study conducted by Longley et al. at a low transmission region in Brazil, where the majority of study population was not infected with *P. vivax* but still presented detectable IgG levels³⁰. Other study of a yearlong cohort also demonstrated IgG positivity and magnitude persistence over 1/year period in absence of qPCR-detectable blood stage *P. vivax* infections³¹. Our results demonstrated that, PvCSP-VK210 presented the highest prevalence of responders, followed by PvCSP-*P. vivax*-like and PvCSP-VK247. Frequency profiles were already described in different Amazon regions and they are consistent with our results. Oliveira-Ferreira et al. have observed the same profile of IgG responders to these PvCSP variants (More responders to PvCSP-VK210, followed by PvCSP-*P. vivax*-like and PvCSP-VK247) in Candeias do Jamari in Rondônia state, in 2004³². However, the mentioned paper found lower frequencies in comparison to our study, which could be related to the use of synthetic peptides as antigens in their ELISA assays. In 2000, Machado and Póvoa evaluated the distribution of PvCSP variants of *P. vivax* from three endemic areas (Belém, Macapá and Porto Velho), and again found a dominance of prevalence similar to ours³³. Years later, Storti-Melo et al. assessed the frequency of PvCSP variants using PCR/RFLP samples from five states of the Brazilian Amazon, Acre, Amapá, Mato Grosso, Pará and Rondônia. Again the profile of distribution of the variants was similar to ours³⁴. Among facts that may explain observed prevalences, we highlight the distinct susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to different PvCSP variants, which depends on the recognition of specific ligands of the peritrophic

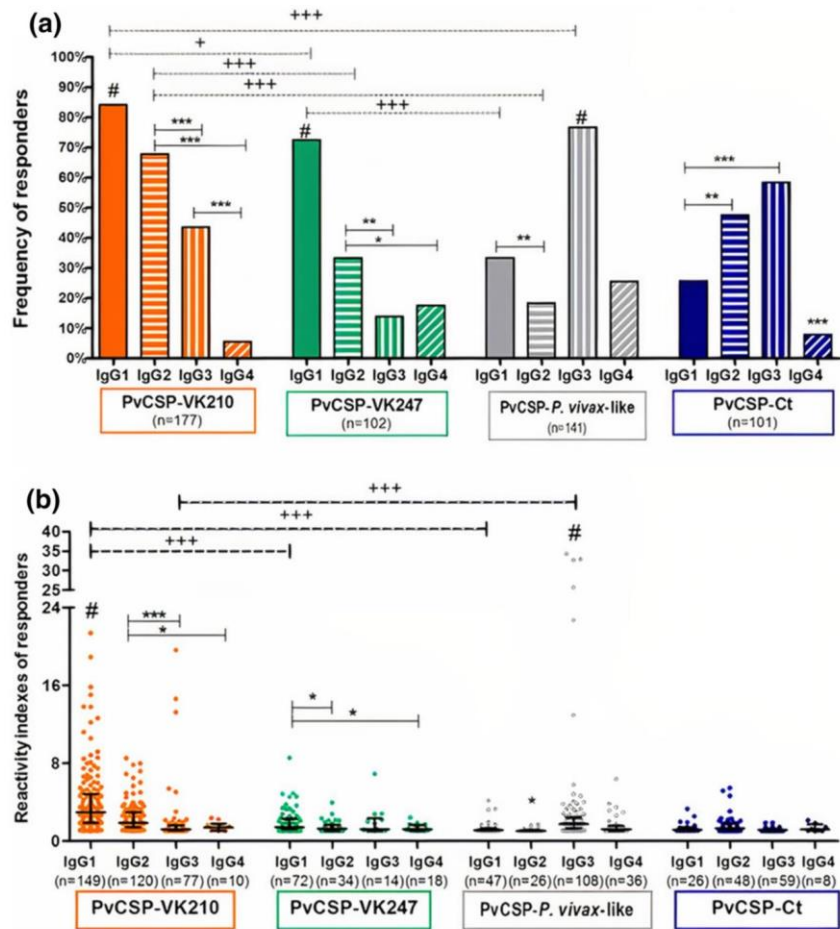


Figure 4. Frequency of IgG subclass responders (a) and their reactivity indexes (b) against the recombinant *PvCSP* proteins in the studied population. Points represent an individual RI against *PvCSP* recombinant proteins (*PvCSP*-VK210: orange points; *PvCSP*-VK247: green points; *PvCSP*-*P. vivax*-like: gray points and *PvCSP*-CT: purple points). A red traced line represents the cutoff for RIs higher than 1 are considered responders to the recombinant protein. Frequencies of responders were compared by Fisher's exact test and RIs were compared by Mann-Whitney test. Significant differences among subclasses were indicated by * and significant differences among responsiveness to each protein were indicated by +; (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$. In this figure # means that the subclass is different from all the others against the same protein.

matrix by ookinete surface proteins, triggering migration or entrapment of the parasite³⁵. A study that used dissected blood fed infected mosquitoes and ELISA assays, demonstrated a preferential development of *PvCSP*-VK210, as compared to that of *PvCSP*-VK247, in *An. aquasalis* and *An. darlingi*, in the state of Pará²⁷. Moreover, frequencies of IgG responders to *PvCSP* recombinant proteins corroborate the co-circulation of all three *P. vivax* variants in Amazon region^{23,24,36}. Besides, the higher frequency of antibodies to VK210 are in accordance with studies that described this variant as the most common in Amazon, while VK247 was rarely reported as single infection^{22,23,34}. In our study we found 28 *P. vivax* infected patients that are non-responders to recombinant proteins and this was already described in literature. In 2018, Oliveira-Ferreira performed a study to evaluate seroprevalence to CSP and demonstrated that not only Brazilian naturally exposed individuals but also *P. vivax* infected ones, were unresponsive to peptides of this protein. In this same study, two specific allelic groups were associated with absence of antibodies against *PvCSP* (HLA-DRB1*01 and HLA-DQB1*05)³⁷. In this scenario, we believe our findings can be explained by well documented associations of the immune response with specific HLA alleles against malaria antigens^{38,39}.

Concerning the functionality of the IgG subclasses, we did observe a predominance of cytophilic antibodies to *PvCSP* variants, once that IgG1 was the prevailing subclass against VK210 and VK247, and IgG3 was the principal IgG subclass of antibodies to *P. vivax*-like. Interestingly, this preponderance of cytophilic antibodies was previously described to *PvCSP* and *PvTRAP*, suggesting that this profile could be associated to the adaptive immune

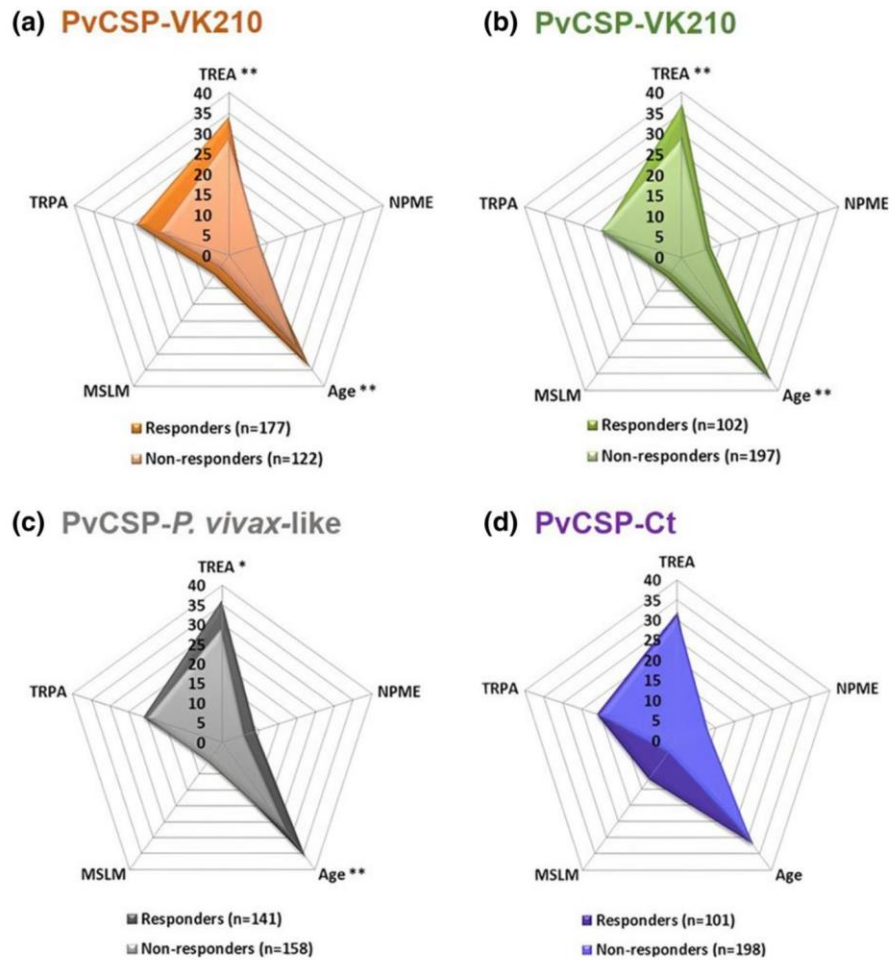


Figure 5. Comparison of epidemiological parameters between responders and non-responders to each *PvCSP* recombinant protein. TREA = Time of residence in endemic area (years), NPME = Number of previous malaria episodes, MSLM = Months since last malaria and TRPA = Time of residence in the present address (years). Epidemiological data of responders and non-responders to each one of the recombinant proteins were compared by Mann–Whitney test.

response against preerythrocyte stage proteins⁴⁰. Moreover, in places where malaria is endemic and the local population has had several malaria episodes through the years, there are evidences that the premonition (immune condition characterizing clinical protection as reflected by the absence of fever and presence of infection at low densities of parasitemia) is reached after repeated infections, due to the presence of both cytophilic antibodies (IgG1 and IgG3) and memory cells^{41–43}. In this context, despite that we not found any significant association between cytophilic antibodies and protection in this study, we believe that these antibodies could act in synergy with other antibodies against preerythrocytic targets, promoting a protective effect. However, it is important to highlight that previous works have already demonstrated heterologous reactivity occurring in antibodies elicited against CSP antigens of *P. vivax* and *P. falciparum*⁴⁴, so, despite the fact that the majority of our recombinant protein responders got in touch with *P. vivax*, we can't affirm that these antibodies are exclusively to *P. vivax*.

For the purpose of elucidating the influence of epidemiological factors in humoral response to *PvCSP* variants and C-terminal region, we correlated induced RIs of IgG and its subclasses with the studied population parameters. We found out that IgG reactivity indexes of *PvCSP*-VK210 and *PvCSP*-*P. vivax*-like presented a trend to increase with time of exposition to infection. This tendency could be explained by both, the preferential development of *PvCSP*-VK210 in predominant species of anopheles mosquitoes in Amazon and the widely geographical distribution of these variants when compared to *PvCSP*-VK247 (suggested to have a lower geographic adaptation in Brazil)^{27,34}. These data may explain why people living longer in these endemic regions tend to have higher IgG reactivity indexes against *PvCSP*-VK210 and *PvCSP*-*P. vivax*-like, since they get in touch more frequently with these two variants. On the other hand, IgG reactivity indexes of *PvCSP*-VK247 presented a tendency of correlation with the number of previous malaria episodes, which is also coherent with

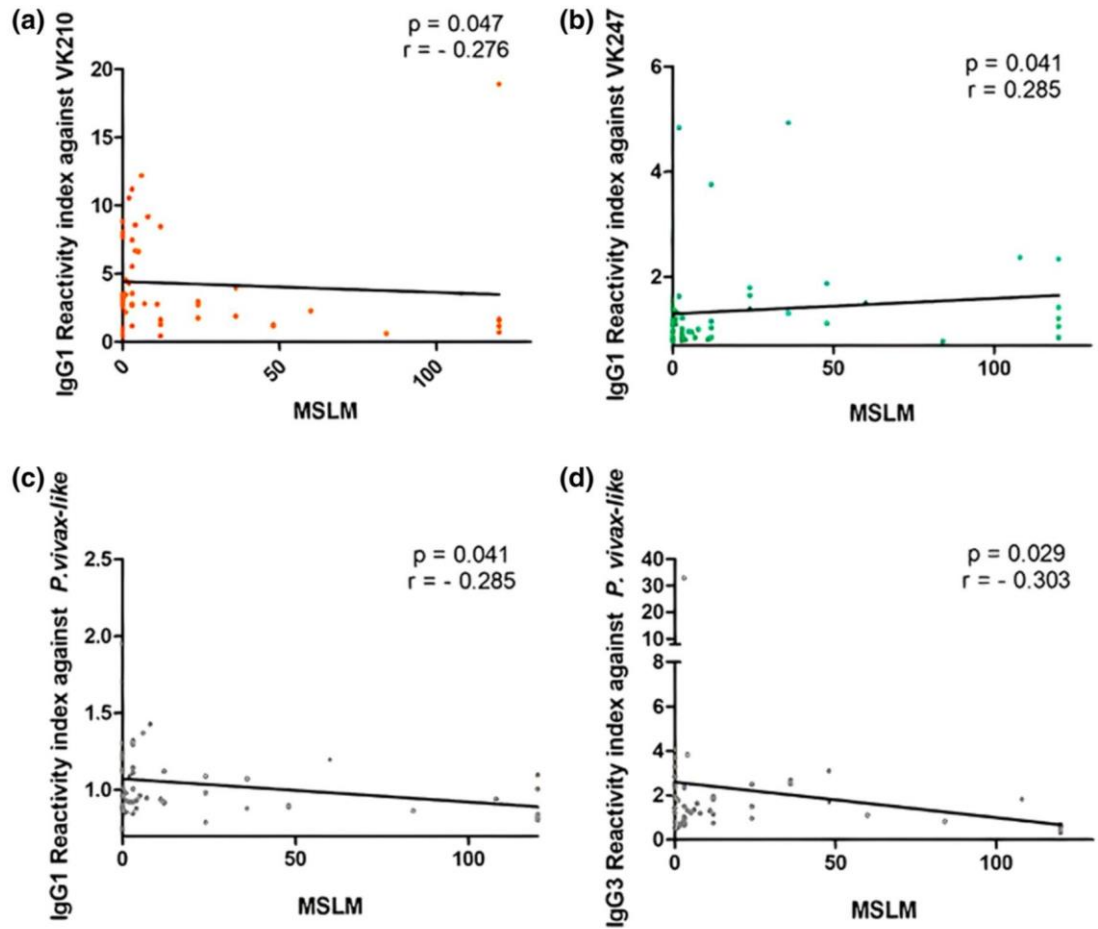


Figure 6. Correlation of RIs of cytophilic IgG subclasses with months since the last malaria (MSLM). (a) Correlation of IgG1 RIs against PvCSP-VK210 with MSLM. (b) Correlation of IgG1 RIs against PvCSP-VK247 with MSLM. (c) Correlation of IgG1 RIs against PvCSP-*P. vivax-like* with MSLM. (d) Correlation of IgG3 RIs against PvCSP-*P. vivax-like* with MSLM.

the aforementioned condition, since individuals that have more infections will probably have more chances to get in touch with this less geographically distributed variant. In our results we have considered three areas as a single one. However, looking separately to these areas, Mâncio Lima and Cruzeiro do Sul demonstrate a similar/higher prevalence of the variant PvCSP-VK247 on PvCSP-*P. vivax-like* as a previous work has demonstrated in other Brazilian endemic areas²⁴.

We have then checked possible correlations between subclass reactivity indexes and epidemiological parameters. Our findings suggest a cumulative effect on IgG1 reactivity indexes against PvCSP-VK210 as a result of previous malaria episodes. On the other hand, PvCSP-VK247 IgG3 RI's presented a direct correlation with the NPME. Differently of the PvCSP variants, the RIs of IgG and its' subclasses able to recognize the C-terminal region of the protein were not able to correlate with any of the epidemiological parameters described. These findings are consistent with those reported by Arévalo-Herrera describing high levels of cytophilic antibodies capable to recognize fragments from both PvCSP N-terminal and repeated regions, based on immunizations with long synthetic peptides in phase I clinical assays, while the C-terminal region was not immunogenic in humans⁴⁵. In addition, despite immunogenic in mice, N or C terminals only (i.e. lacking either VK210 or 247 repeat sequences) also failed to induce protective immunity²⁶. Since Kurtovic et al. pointed complement activation by antibodies as an important mechanism of anti-sporozoite human immunity, one of the possible mechanisms that might explain the non-immunogenic profile of PvCSP-Ct is by means of the complement fragment C3d, capable to limit the anti-CSP C-terminal flanking sequence-specific antibody response by masking epitopes in this region of the molecule. Thus, C3d binding to CSP C-terminal region may represent a mechanism based on the exploitation of the innate immune response by the parasite in order to suppress the development of an acquired immune response against a conserved region of the protein⁴⁶.

In agreement with the previous discussed results, comparison of epidemiological parameters of responders and non-responders to each one of the recombinant proteins presented statistical differences of age and TREA for the three PvCSP allelic variants. Again, only PvCSP-Ct did not present such a difference and induced low

responses in natural exposure conditions. It is interesting to suggest that the production of specific antibodies against the C-terminal region is not conditioned by the TREA or parasite exposure. In fact, the production of antibodies to PvCSP-Ct may be related to the ability of each individual's immune system to circumvent a possible mechanism of parasite-mediated evasion, like we previously suggested.

From all of the studied population (299) individuals, 59 presented specific IgG antibodies to all of PvCSP variants. When compared to individuals that did not respond to at least one of the variants, these individuals presented significantly longer TREA (mean of 6 years). Furthermore, this same group presents inverse correlations between cytophilic RIs (IgG1 against PvCSP-VK210; IgG1 and IgG3 against PvCSP-*P. vivax-like*) and MSLM, suggesting that these specific antibodies could, somehow, represent markers of recent infection. On the other hand, only IgG1 RIs of PvCSP-VK247 were directly correlated with MSLM, implying that these specific antibodies may be important for a protective immune response.

In conclusion, despite the limitations in sample size and study design, our work indicates that IgG positivity and magnitude against PvCSP variants can persist from past infections in the studied population, even in the absence of an ongoing malaria episode. The profile of responders to PvCSP allelic variants and its geographical distribution are still compatible with scientific literature, with dominance of PvCSP-VK210, followed by PvCSP-*P. vivax-like* and PvCSP-VK247. The immune response raised against the recombinant proteins studied here, were mediated, predominantly, by cytophilic antibodies, which have a relevant role to trigger a protective immune response. Conversely, C-terminal region, does not seem to be the best option in vaccine design due to its low-immunogenic properties and absence of correlation with epidemiological parameters and protection indicators. Lastly, taking into account the limitations of the number of individuals enrolled in our study and the unique features of studied population, which is historically exposed to *P. vivax* and *P. falciparum* simultaneously, we can not exclude the possibility of heterologous reactivity of antibodies against *P. vivax* CSP variants. Therefore, other epidemiological studies regarding *P. vivax* allelic variants in other areas are encouraged and essential to address this question and increase the knowledge about the serological landscapes in endemic regions, which is fundamental to develop a global *P. vivax* vaccine.

Methods

Study area and volunteers. The cross-sectional cohort study included 299 individuals from three different communities with malaria transmission in Acre state: Cruzeiro do Sul (n = 124), Guajará (n = 87) and Mâncio Lima (n = 88). Samples of 53 individuals living in non endemic areas of Rio de Janeiro and never exposed to malaria were the control group. Samples and survey data were collected from June to August of 2016. Informed consent was obtained from all donors by written declaration. The study was reviewed and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil.

Epidemiological survey. To evaluate the potential influence of clinical and exposure features on immunity response against PvCSP variants, the donors were interviewed prior the blood sampling. Questions related to personal exposure to malaria, such as time of residence in transmission areas, previous malaria episodes, use of prophylactic measures, symptoms and personal knowledge of malaria transmission were done with all study participants. The answers were stored in Epi-Info databank for subsequent analysis (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Written informed consent was obtained from all adult donors or from parents of donors in the case of minors.

Malaria diagnosis and blood sampling. Blood samples were collected by venipuncture in heparin tubes and centrifuged (350×g, 10/min) to plasma separation and storage at -20°C to ship to Laboratório de Imunoparasitologia, Fiocruz—RJ. Thin and thick blood smears were stained and analyzed for malaria parasites. The diagnosis were done by examination of 200 fields at 1,000× magnifications under oil-immersion and two research experts in malaria diagnosis examined all slides. Individuals positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were treated using the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

Recombinant PvCSP variants expression in HEK-293 T cells. As previously described by Longley et al.³¹, the *P. vivax* sequences used were PvCSPVK210 of Belem strain (GenBank accession number P08677), PvCSPVK247 of Papua New Guinea (GenBank accession number M69059), PvCSPVivax-like of Papua New Guinea (GenBank accession number L13724.1) and PvCSP C-terminal region from Salvador I strain (NCBI Reference Sequence XP_001613068.1). Each one of the domains contained in the multi-variant chimeric recombinant protein used in the Rv21 vaccine described by Salman et al.²⁶ was synthesized and codon-optimized using the Geneart service (fermoFisher), as follows;

C-terminal: NNEGANAPNEKSVKEYLTKVRATVGTWTPCSVTGCVGVRVRRRVNAANKKPEDLTLND-LETDVCTMDK.

VK210: (5x(GDRAAGQPA), 4x(GDRADGQPA), 1x(GNGAGGQAA)); VK247: (2x(ANGAGNQPG/ANGAGGQAA), 1x(ANGAGDQPG/ANGAGDQPG), 1x(ANGADDQPG/ANGAGDQPG), 1x(EDGAGNQPG/ANGAGDQPG)).

Finally, Vivax-like repeats, with a sequence 3x(APGANQEGGAA), 3x(APGANQGGGAA), was obtained from the genebank accession number: AAA18616.

DNA fragments encoding each of the vCSP regions were cloned in the expression vector pHLsec, which is flanked by the chicken η -actin/rabbit η -globin hybrid promoter with a signal secretion sequence and with a modification of a C-tag instead of a His-tag tail.

For expression and purification of vCSP malarial antigens, the codon-optimized coding regions were cloned into the pHLsec vector, as previously described⁴⁷, which is flanked by the chicken η -actin/rabbit η -globin hybrid promoter with a signal secretion sequence and a C-tag (EPEA). The pHLsec plasmids (500 σ g) were transfected in HEK-293 cells using polyethyleneimine (PEI) in roller bottles (surface area of 2,125 cm²) under standard cell culture conditions. Five days after transfection, cells were discarded and media was filtered through 0.22 σ m disposable filters. The secreted protein was purified from the supernatant by affinity chromatography (C-tag column), using the Äkta Start chromatography system and eluted with 2.0 M MgCl₂ and 20 mM Tris, pH 7.0. Finally, the eluted protein was dialysed using Slide-A-Lyzer™ cassette (Fisher Scientific) against 1 \times PBS.

Western Blot. Supernatants from transfected HEK293 cells were boiled at 100 °C for 5 min in Laemmli buffer. Equal amounts cell supernatants were resolved by SDS/PAGE and transferred to PVDF membranes. Blots were blocked with 1 \times PBS-Tween- 5% milk and incubated with an anti-C-Tag antibody (CaptureSelect™ Biotin Anti-C-tag Conjugate at 1:2,000 dilution, supernatants from a MRA-185 hybridoma cell line (2E10.E9) that recognize the VK247 repeats, and supernatants from a MRA-184 hybridoma cell line (2F2) that recognize the VK210 repeats, followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibody (1:5,000). Chemiluminescence (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA) was visualized using the BioRad ChemiDoc SRS device.

Antibody assays. Anti-PvCSP specific antibodies against recombinant VK210, VK247, Vivax-like and C terminal region (CT), were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described by Matos et al.⁴⁸. Briefly, MaxiSorp 96-well plates (Nunc, Rochester, NY, USA) were coated overnight with 1.0 μ g/ml of each recombinant protein. Plates were washed and blocked for 1 h at 37 °C. After blocking, plasma samples (1:100 in PBS-Tween-BSA 5%) were incubated in duplicate wells during 1 h. After three washing steps, bound antibodies were detected with anti-human IgG-PE (Sigma, St. Louis) and followed by addition of o-phenylenediamine and hydrogen peroxide. Plates were read at 492 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The results for total IgG were expressed as reactivity indexes (RIs), which were calculated by the mean optical density (O.D.) of an each tested sample divided by the cut-off number expressed by the mean optical density of 10 non-exposed control individuals' samples plus 3 standard deviation (cut-off values: VK210 = 0.208, Vivax-like = 0.268, VK247 = 0.260 and Ct = 0.245). These 10 non-exposed control individuals' corresponded to 10 higher DO's found in 53 control individuals tested (VK210 = 0.126; 0.131; 0.137; 0.143; 0.146; 0.146; 0.149; 0.153; 0.183; 0.184; Vivax-like = 0.147; 0.175; 0.185; 0.189; 0.191; 0.202; 0.210; 0.210; 0.220; 0.230; VK247 = 0.139; 0.146; 0.149; 0.168; 0.172; 0.178; 0.188; 0.193; 0.215; 0.220; Ct = 0.129; 0.131; 0.137; 0.148; 0.156; 0.182; 0.183; 0.189; 0.192; 0.196). Subjects were scored as responders to PvCSP variants if the RI of IgG against each one of the recombinant proteins was higher than 1. Additionally, the RIs of IgG subclasses for each one of the proteins, were evaluated on responders of each PvCSP variant. The same method was done, using peroxidase-conjugated goat anti-human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (Sigma, St. Louis) (cut-off—VK210 IgG1 = 0.158, IgG2 = 0.168, IgG3 = 0.194 and IgG4 = 0.315, Vivax-like IgG1 = 0.060, IgG2 = 0.053, IgG3 = 0.110 and IgG4 = 0.065, VK247 IgG1 = 0.234, IgG2 = 0.337, IgG3 = 0.288 and IgG4 = 0.439 and Ct IgG1 = 0.161, IgG2 = 0.308, IgG3 = 0.191 and IgG4 = 0.284).

Statistical analysis. Statistical analyses were done in GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.). Normality test were done in all variables using the one-sample Kolmogorov-Smirnov test. The Dunn's test was used to compare RIs of IgG against recombinant PvCSP variants in studied groups. Uncorrected Fisher's plus LSD was done to access the differences in proportions of IgG, IgG subclass. Correlations between immune response and epidemiological parameters were evaluated by Spearman rank test. A two-sided p value < 0.05 was considered significant.

Ethics approval and consent to participate. Written consent for use of plasma samples and survey data were obtained in accordance to the revised Declaration of Helsinki. Both collection and consent protocols were under approval of Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248).

Data availability

The present manuscript includes all datasets generated for this study.

Received: 25 October 2019; Accepted: 2 August 2020

References

- Collins, W. E. & Contacos, P. G. Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by X-irradiated sporozoites. *Nat. New Biol.* **236**, 176–177 (1972).
- Gwadz, R. W., Cochrane, A. H., Nussenzweig, V. & Nussenzweig, R. S. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bull. World Health Organ.* **57**(Suppl 1), 165–173 (1979).
- Herrington, D. et al. Successful immunization of humans with irradiated malaria sporozoites: Humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 539–547 (1991).
- Mota, M. M. & Rodriguez, A. Migration through host cells: The first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell. Microbiol.* **6**, 1113–1118. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00460.x> (2004).
- Kappe, S. H., Buscaglia, C. A. & Nussenzweig, V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 29–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.011603.150935> (2004).

6. Huang, Y. T., Lu, X. M., Jin, X. B. & Zhu, J. Y. Research advances on circumsporozoite protein of *Plasmodium*. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.* **30**, 238–242 (2012).
7. Rodriguez-Galan, A. *et al.* An in vitro assay to measure antibody-mediated inhibition of *P. berghei* sporozoite invasion against *P. falciparum* antigens. *Sci. Rep.* **7**, 17011. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17274-5> (2017).
8. Garçon, N., Heppner, D. G. & Cohen, J. Development of RTS, S/AS02: A purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* **2**, 231–238. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.2.231> (2003).
9. PATH. *Malaria Vaccine Initiative* (2017).
10. Vandoolaeghe, P. & Schuerman, L. *et al.* RTS, S/AS01 malaria vaccine in children 5 to 17 months of age at first vaccination. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 1481–1493. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1236689> (2016).
11. Ouattara, A. & Laurens, M. B. Vaccines against malaria. *Clin. Infect. Dis.* **60**, 930–936. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu954> (2015).
12. Zubairi, A. B. *et al.* Severe *Plasmodium vivax* malaria in Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1851–1854. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130495> (2013).
13. Llanos-Chea, F. *et al.* Characteristics of travel-related severe *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in individuals hospitalized at a Tertiary Referral Center in Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 1249–1253. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0652> (2015).
14. Nadkar, M. Y., Huchche, A. M., Singh, R. & Pazare, A. R. Clinical profile of severe *Plasmodium vivax* malaria in a tertiary care centre in Mumbai from June 2010–January 2011. *J. Assoc. Physicians India* **60**, 11–13 (2012).
15. Medina-Morales, D. A., Montoya-Franco, E., Sanchez-Aristizabal, V. D., Machado-Alba, J. E. & Rodriguez-Morales, A. J. Severe and benign *Plasmodium vivax* malaria in Embera (Amerindian) children and adolescents from an endemic municipality in Western Colombia. *J. Infect. Public Health* **9**, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.09.001> (2016).
16. Price, R. N. *et al.* Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis* **14**, 982–991. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70855-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70855-2) (2014).
17. Rijken, M. J. *et al.* Chloroquine resistant vivax malaria in a pregnant woman on the western border of New Guinea. *Malaria J.* **10**, 113. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-113> (2011).
18. Graf, P. C. *et al.* Failure of supervised chloroquine and primaquine regimen for the treatment of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Malaria Res. Treat.* **2012**, 936067. <https://doi.org/10.1155/2012/936067> (2012).
19. Arnot, D. E. *et al.* Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: Gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science* **230**, 815–818 (1985).
20. Rosenberg, R. *et al.* Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* **245**, 973–976 (1989).
21. Qari, S. H. *et al.* Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. *Lancet* **341**, 780–783 (1993).
22. Souza-Neiras, W. C. *et al.* *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: A limited variation or new subspecies with major biological consequences? *Malaria J.* **9**, 178. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-178> (2010).
23. Machado, R. L. & Póvoa, M. M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**, 377–381 (2000).
24. Arruda, M. E., Zimmerman, R. H., Souza, R. M. & Oliveira-Ferreira, J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 367–371 (2007).
25. Yadava, A. *et al.* A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. *Infect. Immun.* **75**, 1177–1185. <https://doi.org/10.1128/IAI.01667-06> (2007).
26. Salman, A. M. *et al.* Rational development of a protective *P. vivax* vaccine evaluated with transgenic rodent parasite challenge models. *Sci. Rep.* **7**, 46482. <https://doi.org/10.1038/srep46482> (2017).
27. da Silva, A. N., Santos, C. C., Lacerda, R. N., Machado, R. L. & Póvoa, M. M. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 547–550 (2006).
28. Gonzalez-Ceron, L. *et al.* Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. *Infect. Immun.* **67**, 410–412 (1999).
29. Branquinho, M. S. *et al.* Infection of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of Sao Vicente and Juquitiba, Sao Paulo. *Pan Am. J. Public Health* **2**, 189–193 (1997).
30. Longley, R. J. *et al.* Asymptomatic *Plasmodium vivax* infections induce robust IgG responses to multiple blood-stage proteins in a low-transmission region of western New Guinea. *Malaria J.* **16**, 178. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1826-8> (2017).
31. Longley, R. J. *et al.* Acquisition and longevity of antibodies to *Plasmodium vivax* preerythrocytic antigens in Western New Guinea. *Clin. Vaccine Immunol.* **23**, 117–124. <https://doi.org/10.1128/CVI.00501-15> (2016).
32. Oliveira-Ferreira, J. *et al.* HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop.* **92**, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.02.011> (2004).
33. Machado, R. L. & Póvoa, M. M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**, 377–381 (2000).
34. Storti-Melo, L. M. *et al.* *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**, 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.07.018> (2009).
35. Gonzalez-Ceron, L. *et al.* *Plasmodium vivax*: Impaired escape of Vvk210 phenotype ookinetes from the midgut blood bolus of *Anopheles pseudopunctipennis*. *Exp. Parasitol.* **115**, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.06.001> (2007).
36. Bonilla, J. A., Validum, L., Cummings, R. & Palmer, C. J. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Pvpsc and Pvmsp1 in Guyana, South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 830–835 (2006).
37. Pereira, V. A. *et al.* Evaluating seroprevalence to circumsporozoite protein to estimate exposure to three species of *Plasmodium* in the Brazilian Amazon. *Infect. Dis. Poverty* **7**, 46. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0428-1> (2018).
38. Hill, A. V. *et al.* Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* **352**, 595–600. <https://doi.org/10.1038/352595a0> (1991).
39. Lima-Junior, J. C. *et al.* Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3alpha and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. *PLoS ONE* **7**, e36419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036419> (2012).
40. Lopez, C., Yepes-Perez, Y., Hincapie-Escobar, N., Diaz-Arevalo, D. & Patarroyo, M. A. What is known about the immune response induced by *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates? *Front. Immunol.* **8**, 126. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00126> (2017).
41. Baird, J. K. *et al.* Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 65–76 (1991).
42. Perignon, J. L. & Druilhe, P. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **89**(Suppl 2), 51–53 (1994).
43. Doolan, D. L., Dobano, C. & Baird, J. K. Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 13–36. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08> (2009).

44. Hall, C. E. *et al.* Mosquito bite-induced controlled human malaria infection with *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* generates immune responses to homologous and heterologous preerythrocytic and erythrocytic antigens. *Infect. Immunity* <https://doi.org/10.1128/IAI.00541-18> (2019).
45. Arevalo-Herrera, M. *et al.* Antibody-mediated and cellular immune responses induced in naive volunteers by vaccination with long synthetic peptides derived from the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **84**, 35–42. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.09-0507> (2011).
46. Bergmann-Leitner, E. S. *et al.* C3d binding to the circumsporozoite protein carboxy-terminus deviates immunity against malaria. *Int. Immunol.* **17**, 245–255. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh205> (2005).
47. Rodrigues-da-Silva, R. N. *et al.* *Plasmodium vivax* cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites: Naturally acquired humoral immune response and B-Cell epitope mapping in Brazilian Amazon inhabitants. *Front. Immunol.* **8**, 77. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00077> (2017).
48. Matos, A. D. S. *et al.* Antibody responses against *Plasmodium vivax* TRAP recombinant and synthetic antigens in naturally exposed individuals from the Brazilian Amazon. *Front. Immunol.* **10**, 2230. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02230> (2019).

Acknowledgements

We are grateful to all individuals who participated in this study for their cooperation and generous donation of blood, which made this study possible. CTDR, JOF and JCLJ receive a “Research Productivity Fellowship” from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and CTDR and JCLJ are recipients of a grant from Faperj as *Cientistas do Nosso Estado* and *Jovem Cientista do Nosso Estado*, respectively. ff is work was also funded by the CNPq/Papes (Programa de Apoio Pesquisa Estratégica em Saúde), Inovabio grant program (BIO-004-FIO-17-2-11-Bio-Manguinhos/Fiocruz) and Fiocruz (PAEF II, IOC-023-FIO-18-2-47). ff e following reagent was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: Hybridoma 2E10.E9 Anti-*Plasmodium vivax*/Circumsporozoite Protein (CSP), MRA-185, and the Hybridoma 2F2 Anti-*Plasmodium vivax*/Circumsporozoite Protein (CSP), MRA-184, contributed by Elizabeth Nardin.

Author contributions

Study designing: J.C.L.-J., A.R.-S. and L.P.-R. Performed experiments, data analysis and manuscript preparation: I.F.-S., R.R.-d-S. and C.L.-C. Performed experiments: A.S.-M. Field work support: B.O.-P., R.M.-S., P.R.-T. and C.T.-R. Recombinant cloning and protein expression: C.L.-C. Protein purification and QC assays: C.L.-C., K.H., A.M.-G., Y.-C.K. and E.O.-F. Manuscript review and data analysis: J.O.-F., C.T.-R., J.L.-J., A.R.-S., I.F.-S., R.R.-d-S. and C.L.-C.

Competing interests

ff e authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70893-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.d.L.-J.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access ff is article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. ff e images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© ff e Author(s) 2020