

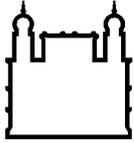
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Caracterização molecular e avaliação do impacto da variabilidade genética nos epítomos de células B das proteínas candidatas vacinais de *Plasmodium vivax*: PvCyRPA (*P. vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen) e Pvs25 (*P. vivax* Ookinete Surface Protein)

LANA BITENCOURT CHAVES

Rio de Janeiro
Março de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LANA BITENCOURT CHAVES

Caracterização molecular e avaliação do impacto da variabilidade genética nos epítomos de células B das proteínas candidatas vacinais de *Plasmodium vivax*: PvCyRPA (*P. vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen) e Pvs25 (*P. vivax* Ookinete Surface Protein)

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Parasitária.

ORIENTADOR: Dr. Josué da Costa Lima Junior.

RIO DE JANEIRO
Março de 2022

Bitencourt Chaves, Lana.

Caracterização molecular e avaliação do impacto da variabilidade genética nos epítomos de células B das proteínas candidatas vacinais de *Plasmodium vivax*: PvCyRPA (*P. vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen) e Pvs25 (*P. vivax* Ookinete Surface Protein) / Lana Bitencourt Chaves. - Rio de Janeiro, 2022.

136 f.; il.

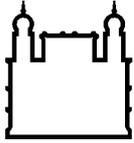
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientador: Josué da Costa Lima Junior.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Malária. 2. Amazônia Brasileira. 3. *Plasmodium vivax*. 4. Diversidade genética. 5. Predição de epítomos. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: LANA BITENCOURT CHAVES

Caracterização molecular e avaliação do impacto da variabilidade genética nos epítomos de células B das proteínas candidatas vacinais de *Plasmodium vivax*: PvCyRPA (*P. vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen) e Pvs25 (*P. vivax* Ookinete Surface Protein)

ORIENTADOR: Dr. Josué da Costa Lima Junior

Aprovada em: 07/03/2022

EXAMINADORES:

Dra. Fernanda Nazaré Morgado (Fiocruz-RJ)
Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Fiocruz-RJ)
Dr. Gustavo Capatti Cassiano (UNICAMP)
Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes (Fiocruz-RJ)
Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel (UFJF)

Rio de Janeiro, 07 de março de 2022.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de **Lana Bitencourt Chaves**, sob orientação do Dr. Josué da Costa Lima Júnior. Ao sétimo dia do mês de março de dois mil vinte e dois, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: "**Caracterização molecular e avaliação do impacto da variabilidade genética nos epítomos de células B das proteínas candidatas vacinais de *Plasmodium vivax*: PvCyRPA (*P. vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen) e Pvs25 (*P. vivax* Ookinete Surface Protein)**", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Genética de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto– IOC/FIOCRUZ, Dr. Gustavo Capatti Cassiano – UNICAMP/SP, e como suplentes: Dr^a. Flávia Lima Ribeiro Gomes- IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Kézia Katiani Gorza Scopel - UFJF/JF. 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 tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 7 de março de 2022.

Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado (Presidente da Banca): *Fernanda Nazaré Morgado*

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa): *André Luiz Rodrigues Roque*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço a Deus, por sempre me abençoar e iluminar o meu caminho. Aquele que cuida de mim e me guia a cada segundo. Aquele que sempre me deu forças, discernimento e serenidade ao longo de toda trajetória.

A caminhada científica é longa e, por muitas vezes, cansativa. No entanto, durante todo esse caminho percorrido, desde a minha aprovação no processo seletivo até aqui, contei com ajuda de muitas pessoas que me apoiaram, e outras que também participaram deste trabalho. Todos, de certa forma, foram fundamentais para a conclusão desta etapa. A todos vocês, muito obrigada!!!

Em especial, agradeço aos meus amigos e familiares que me apoiaram e que participaram de momentos tão importantes ao longo desse tempo. Aos meus amados pais Claudia e Alan, minha imensa gratidão. Obrigada por todo amor incondicional e incentivo!!! Agradeço também ao meu querido irmão Diego. Obrigada por sempre acreditar em mim e me apoiar em tudo!!

Ao meu querido marido Allan Alves pelo imenso amor, carinho, atenção e cumplicidade. Obrigada por estar sempre ao meu lado e me apoiar em todos os momentos!! Obrigada por sempre acreditar em mim e me encorajar quando fiquei sem forças para seguir em frente!!

Ao meu querido orientador Dr. Josué da Costa Lima Junior, por ter me recebido em seu laboratório e por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse lindo trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, incentivo, confiança, conselhos e amizade. Obrigada por todos esses 6 anos, desde o momento em que entrei para o nosso "time". Foram anos valiosos que contribuíram principalmente para o meu crescimento profissional e acadêmico. Hoje eu vejo o quanto evoluí profissionalmente e te agradeço imensamente por isso. Obrigada por tudo!!!

Agradeço também a Dra. Daiana de Souza Perce da Silva por ter sido tão maravilhosa e presente ao longo desses anos. Agradeço não só pelos ensinamentos, que foram fundamentais desde o momento em que entrei no laboratório, mas principalmente pelo seu incentivo de sempre, pelo enorme carinho, pelas conversas, conselhos e risadas que tornaram os meus dias ainda mais alegres. Muito obrigada pela bela amizade que construímos ao longo desses anos, minha eterna mãezinha científica!!!

À Dra. Dalma Maria Banic, do Laboratório de Imunologia clínica. Muito obrigada pelo apoio, atenção e carinho de sempre, seu incentivo, sua amizade e todos os

valiosos ensinamentos. Lembro exatamente do momento em que me recebeu de braços abertos e com muito carinho em seu antigo laboratório, e a partir desse dia se tornou muito especial na minha vida.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia, onde eu comecei a trajetória desde a iniciação científica ao lado da Dra. Paula Mello De Luca, e onde eu tive o seu apoio, além do companheirismo de muitas pessoas.

Agradeço às amigas de laboratório: Ada Matos, Isabela Soares, Rafaela Veiga, Alinne Renzetti, Thaize Quiroga e Vanessa Souza, pela amizade e por cada café da tarde, que deixavam os meus dias um pouco mais leves. Em especial, agradeço à Ada e Isabela, que se tornaram muito mais que parceiras de laboratório, mas amigas que eu levarei por toda a minha vida. Agradeço também à minha aluna de iniciação científica, Glaucia de Oliveira, que foi o meu braço direito em muitos experimentos de Diagnóstico Molecular e tivemos uma parceria maravilhosa, além do carinho e da amizade que construímos.

Agradeço também a querida Dra. Léa Cysne pelas belas e sábias palavras, por todo amor, cuidado, atenção e incentivo, desde a iniciação científica. Por todos os momentos em que me deu conselhos e adoráveis abraços que deixavam as minhas manhãs ainda mais felizes.

Também agradeço às queridas técnicas do laboratório Rose e Vera, que sempre estiveram presentes no meu dia a dia no laboratório. Em especial, agradeço a minha querida Cátia, que trabalha na limpeza do nosso andar. Uma pessoa maravilhosa e de coração imenso, que sempre teve um grande carinho e sempre foi muito especial, desde o meu ingresso ao laboratório. Obrigada não apenas pelo seu auxílio diário como profissional, mas principalmente pelas nossas inúmeras conversas, pelo carinho, abraços, apoio, incentivo e infinitas risadas, até mesmo nos momentos de cansaço após um longo dia de experimentos.

Agradeço também ao Laboratório de Pesquisa em Malária, não apenas à colaboração científica desde o início, mas por terem me recebido tão bem e onde eu trabalhei durante um longo período em parceria com a Dra. Lilian Riccio no diagnóstico molecular das amostras de campo.

À Dra. Fernanda Nazaré Morgado por aceitar o convite de fazer a revisão desta tese e aos membros da banca examinadora pela participação: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto, Dr. Gustavo Capatti Cassiano, Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes, Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel.

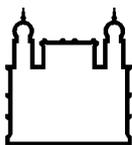
Às funcionárias da Plataforma de Sequenciamento do IOC, Dra. Aline dos Santos Moreira e Beatriz de Lima Alessio Muller.

À FIOCRUZ e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, em especial agradeço a Rita Gomes. Sempre presente e me salvando em momentos de desespero, principalmente com coisas burocráticas. Sempre muito atenciosa comigo e muito solícita, desde o dia em que me matriculei na pós-graduação. Muito obrigada por tudo!!

Aos órgãos de fomento CNPq, Capes e FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Aos amigos da turma do Mestrado e doutorado pelos bons momentos juntos. Obrigada por tornar todas as aulas ainda mais agradáveis e divertidas, e pelas amizades que ganhei ao longo desses anos.

Agradeço a todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização de mais uma etapa importante em minha vida, e principalmente agradeço por todos esses 10 anos de FIOCRUZ, que foi a minha segunda casa tão amada!!! MUITO OBRIGADA!!!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização molecular e avaliação do impacto da variabilidade genética nos epítomos de células B das proteínas candidatas vacinais de *Plasmodium vivax*: PvCyRPA (*P. vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen) e Pvs25 (*P. vivax* Ookinete Surface Protein)

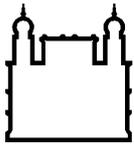
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

LANA BITENCOURT CHAVES

As infecções causadas por *Plasmodium vivax* representam um grande problema de saúde pública, sendo esta espécie, dentre as demais do gênero *Plasmodium*, considerada uma das mais difíceis de se eliminar. Por esse motivo, a pesquisa de antígenos candidatos vacinais específicos para *P. vivax* necessita de impulso, visto que atualmente existe apenas uma única candidata vacinal em ensaios clínicos na iniciativa global de desenvolvimento de vacinas antimaláricas. Torna-se assim fundamental a pesquisa de novos candidatos vacinais. Nesse contexto, as proteínas PvCelTOS, PvCyRPA e Pvs25 vêm sendo consideradas novas alternativas na busca de candidatos vacinais contra a malária. Embora expressas em estágios diferentes, individualmente, desempenham importantes funções durante as fases pré-eritrocítica, eritrocítica e sexuada do ciclo biológico do *P. vivax*. Entretanto, dada a complexidade do ciclo biológico do *Plasmodium*, acreditamos que uma composição antigênica ideal deveria ser direcionada a múltiplos estágios de desenvolvimento do parasito. Nesse sentido, nos propomos a identificar estas sequências de PvCelTOS (dados anteriormente publicados no final do mestrado), PvCyRPA (presente estudo – **Artigo 1**) e Pvs25 (presente estudo – **Artigo 2**) em isolados brasileiros, mapear as regiões imunogênicas conservadas e avaliar a resposta imune naturalmente adquirida de indivíduos expostos ao *P. vivax*, para a construção de um antígeno quimérico potencialmente vacinal contra os três estágios de desenvolvimento do parasito no hospedeiro vertebrado (esporozoítos, merozoítos e oocinetos). Destarte, identificamos e caracterizamos os genes *pvcyrpa* e *pvs25* em 98 isolados da Amazônia Brasileira, e seus impactos na antigenicidade dos epítomos de células B. Parâmetros de diversidade genética, análise genética populacional, teste de neutralidade e rede de junção de medianas foram analisados, bem como o impacto dos polimorfismos de aminoácidos nos epítomos de células B, utilizando as ferramentas de sequenciamento genético e predição de epítomos. O gene *pvcyrpa* apresenta uma variação moderada, o que poderia influenciar os potenciais epítomos de células B e, conseqüentemente, o reconhecimento de anticorpos. Apesar das alterações de aminoácidos observadas na população e sequências estudadas em todo o mundo, os potenciais alvos de anticorpos não parecem ser significativamente afetados. Em relação ao gene *pvs25*, nossos dados sugerem que é um gene conservado entre os isolados brasileiros. Nossos dados apresentam uma observação importante, considerando a potencialidade desses antígenos como uma vacina candidata para cobrir distintas áreas endêmicas de *P. vivax* em todo o mundo.

Palavras-chave: Malária, Amazônia Brasileira, *Plasmodium vivax*, PvCyRPA, Pvs25, diversidade genética, predição de epítomos, proteína recombinante multiestágio.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Molecular characterization and evaluation of the impact of genetic variability on B cell epitopes of *Plasmodium vivax* vaccine candidate's proteins: PvCyRPA (*P. vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen) and Pvs25 (*P. vivax* Ookinete Surface Protein)

ABSTRACT

PHD THESIS PARASITE BIOLOGY

LANA BITENCOURT CHAVES

Infections caused by *Plasmodium vivax* represent a major public health problem, and this species is considered one of the most difficult to eliminate among *Plasmodium* spp. For this reason, the search for specific vaccine candidate antigens for *P. vivax* needs a boost, as there is currently only a single vaccine candidate in clinical trials in the global anti-malarial vaccine development initiative. Thus, the search for new vaccine candidates becomes essential. In this context, the proteins PvCelTOS, PvCyRPA and Pvs25 have been considered new alternatives in the search for vaccine candidates against malaria. Although expressed at different stages, individually, they play important roles during the pre-erythrocytic, erythrocytic and sexual phases of the *P. vivax* life cycle. However, given the complexity of the *Plasmodium* life cycle, we believe that an ideal antigenic composition should target multiple stages of parasite development. In this sense, we propose to identify these sequences of PvCelTOS (data previously published at the end of the master's), PvCyRPA (present study - **Article 1**) and Pvs25 (present study - **Article 2**) in Brazilian isolates, map the conserved immunogenic regions and evaluate the naturally acquired immune response of individuals exposed to *P. vivax*, for the construction of a chimeric antigen potentially vaccinating against the three stages of development of the parasite in the vertebrate host (sporozoites, merozoites and ookinetes). Thus, we identified and characterized the *pvcyrpa* and *pvs25* genes in 98 isolates from the Brazilian Amazon, and their impacts on the antigenicity of B cell epitopes. Parameters of genetic diversity, population genetic analysis, neutrality test and median junction network were analyzed, as well as the impact of amino acid polymorphisms on B cell epitopes, using genetic sequencing and epitope prediction tools. The *pvcyrpa* gene shows moderate variation, which could influence potential B cell epitopes and, consequently, antibody recognition. Despite the observed amino acid changes in the population and sequences studied worldwide, potential antibody targets do not appear to be significantly affected. Regarding the *pvs25* gene, our data suggest that it is a conserved gene among Brazilian isolates. Our data present an important observation, considering the potential of these antigens as a candidate vaccine to cover different endemic areas of *P. vivax* worldwide.

Keywords: Malaria, Brazilian Amazon, *Plasmodium vivax*; PvCyRPA, Pvs25, genetic diversity, epitope prediction, multistage recombinant protein.

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1 Introdução	17
1.1 Malária: contexto histórico e aspectos gerais	17
1.2 A malária no mundo	18
1.3 A malária no Brasil	22
1.4 Biologia do parasito	26
1.5 Diversidade genética e estrutura populacional do <i>Plasmodium vivax</i>	31
1.6 Diversidade genética e resposta imune.....	33
1.7 Diagnóstico laboratorial de malária	35
1.8 Estratégias de controle da malária	36
1.9 A busca por uma vacina antimalárica.....	37
1.10 Principais antígenos candidatos vacinais	43
1.11 Desenvolvimento de vacinas contra o <i>Plasmodium vivax</i>	47
1.12 CelTOS (Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites).....	49
1.13 CyRPA (Cysteine-Rich Protective Antigen)	52
1.14 P25 (Ookinete Surface Protein).....	55
2 JUSTIFICATIVA.....	58
3 OBJETIVOS.....	59
3.1 Objetivo geral	59
3.2 Objetivos específicos.....	59
4 RESULTADOS.....	60
4.1 Artigo 1 (PvCyRPA) - Genetic Diversity of <i>Plasmodium vivax</i> Cysteine-Rich Protective Antigen (PvCyRPA) in field isolates from five different areas of the Brazilian Amazon.	60
4.2 Artigo 2 (Pvs25) - <i>Plasmodium vivax</i> Ookinete Surface Protein (Pvs25) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon.....	78
5 DISCUSSÃO.....	87
6 PERSPECTIVAS	94
7 CONCLUSÕES.....	95
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
9 ANEXOS.....	115

9.1	Anexo I – Artigo PvCeITOS (1º autora)	115
9.2	Anexo II – Artigo PvCeITOS (coautoria)	135
9.3	Anexo III – Artigo PvTRAP (coautoria)	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial de malária em 2000 e seu status até 2020.	20
Figura 2 - Casos de malária notificados no Brasil, 1959 – 2020.....	23
Figura 3 - Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2020.....	24
Figura 4 - Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado.	26
Figura 5 - Panorama global de vacinas antimaláricas atualmente em ensaios clínicos.	40
Figura 6 - Modelo para a CelTOS na passagem celular.....	50
Figura 7 - Comparação das sequências de aminoácidos da CelTOS de <i>P. berghei</i> (PbCelTOS) com as ortólogas de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	51
Figura 8 - Comparação entre as estruturas envolvidas no processo de invasão ao eritrócito por (A) <i>P. knowlesi</i> e (B) <i>P. falciparum</i>	53
Figura 9 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no inseto vetor e expressão gênica da P25.	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
AMA-1	Apical Membrane Antigen-1 (Antígeno 1 de membrana apical)
<i>An</i>	<i>Anopheles</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Grau Celsius
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
CSP	Circumsporozoite protein (Proteína circunsporozoíta)
CZS	Cruzeiro do Sul
DBP	Duffy Binding Protein (Proteína de ligação ao antígeno Duffy)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ddNTPs	Didesoxinucleotídeo Trifosfatados
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	Força da gravidade
G6PD	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
GJ	Guajará
H	Haplótipos
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)
IEDB	Immune Epitope Database and Analysis Resource
IFN	Interferon
IPA	Incidência Parasitária Anual
MAO	Manaus
Min	Minutos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

ML	Mâncio Lima
mL	Mililitro
µL	Microlitros
MSP	Merozoite Surface Protein (Proteína de superfície do merozoíto)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
OIA	Oiapoque
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
PNCM	Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária
PvCelTOS	<i>P. vivax</i> Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (Proteína de travessia celular de oocinetos e esporozoítos de <i>P. vivax</i>)
PvCyRPA	<i>P. vivax</i> Cysteine-Rich Protective Antigen (Antígeno protetor rico em cisteína de <i>P. vivax</i>)
Pvs25	<i>P. vivax</i> Ookinete Surface Protein (Proteína de superfície de oocinetos de <i>P. vivax</i>)
RPM	Rotações por minuto
Sal-1	Salvador-1
SNP	Single Nucleotide Polimorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)
TA	Temperatura ambiente
TDRs	Testes de diagnóstico rápido
Tp	Tampão de sequenciamento

TRAP Thrombospondin-Related Anonymous Protein (Proteína adhesiva relacionada a trombospondina)

UV Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: contexto histórico e aspectos gerais

Também conhecida como paludismo (do latim *palus*, pântano), impaludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã benigna, febre terçã maligna, além de nomes populares como maleita, sezão, tremedeira, bateadeira ou febre, a malária acompanha os seres humanos desde a antiguidade (1). Acredita-se, inclusive, que a origem dessa doença é anterior ao surgimento da espécie humana, devido à grande diversidade de plasmódios existentes e à capacidade de infectar diferentes vertebrados terrestres (2). Além disso, avanços em paleoparasitologia permitiram que cientistas conduzissem estudos moleculares e identificassem o DNA de *Plasmodium* em múmias, confirmando assim o caráter ancestral desta doença (3).

A malária foi primeiramente descrita por Hipócrates, na era pré-cristã, quem descreveu as características da doença, como a ocorrência de febre intermitente (4). Apenas no início do século XIX é que o termo malária passou a ser utilizado. Os romanos pensavam que a doença era causada por vapores eliminados nos pântanos, chamando a doença de “*mau aire*”, em sentido literal “mau ar” (5). Acreditava-se que a doença provinha dos miasmas, emanações venenosas das águas paradas dos pântanos. A suposição da natureza miasmática da doença foi amplamente difundida, até que em 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran identificou devidamente o parasito *Plasmodium* como o agente responsável por causar a malária, enquanto a incriminação dos mosquitos como vetores foi feita pelo médico britânico Ronald Ross, em 1894 (6, 7).

Desde a antiguidade, a malária teve um impacto direto sobre a saúde, com efeitos indiretos em fatores como desenvolvimento econômico, migração e conflitos militares na história mundial. A partir do momento em que a malária foi reconhecida, tem sido notória a importância das condições ambientais aliadas às transformações socioeconômicas na transmissão da doença. Sua transmissão, nos seres humanos, se estabeleceu possivelmente a cerca de 10 mil anos antes de Cristo (a.C.) com o advento da agricultura. Nesse momento histórico, houve um grande aumento da densidade na população humana e vetorial, quando o homem deixou de ser nômade e passou a viver em assentamentos (8).

A partir dos inúmeros avanços na pesquisa, atualmente sabe-se que a malária é uma doença infecciosa e parasitária que apresenta elevada prevalência e morbidade. É causada por protozoários do Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Haemosporida, Família Plasmodiidae e Gênero *Plasmodium*, no qual são descritas aproximadamente 250 espécies capazes de infectar aves, mamíferos e répteis (9, 10). Dentre estas, cinco espécies principais se destacam por infectar naturalmente os seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* (*curtisi* e *wallikeri*), *P. malariae* e *P. knowlesi* (11). Além das espécies *P. cynomolgi* e *P. simium*, que são responsáveis por causar uma malária simiana, por meio da transmissão zoonótica (12).

A transmissão da malária se dá através da picada do inseto vetor, fêmeas de mosquitos infectadas pertencentes ao gênero *Anopheles* (mosquito prego). Pelo menos 465 espécies já foram reconhecidas, tendo aproximadamente 70 espécies documentadas como transmissoras da malária humana com diferentes capacidades vetoriais. Essa transmissão varia entre espécies e, em muitos casos, entre populações de mosquitos. Algumas espécies têm um papel decisivo na transmissão da malária em áreas endêmicas, enquanto outras espécies têm papel secundário com relevância local ou ocasional (13).

A importância de uma espécie de mosquito na transmissão depende da sua capacidade e competência vetorial. A capacidade vetorial está relacionada com a intensidade da transmissão do parasito e é analisada pela densidade dos vetores, a taxa de picada, a quantidade de parasitos por inóculo e a longevidade do mosquito. Enquanto que a competência vetorial é a capacidade intrínseca do mosquito que permite a replicação e transmissão do parasito (14). Dentre as espécies de malária com maior competência vetorial para transmitir o *Plasmodium* destacam-se: *An. darlingi* como principal mosquito vetor no Brasil (15) e *An. aquasalis* como vetor secundário (16); espécies do complexo *An. gambiae* na África; e *An. dirus* e *An. minimus* no sudeste asiático (9, 13).

1.2 A malária no mundo

A malária é uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo, sendo ainda considerada um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais. Globalmente, em 2019, havia cerca de 227 milhões de casos de

malária em 85 países endêmicos de malária. Em 2020, de acordo com o último relatório mundial de malária, após 1 ano da pandemia de covid-19 e interrupções nos serviços de saúde, o número estimado subiu para 241 milhões de casos da doença e 627 mil mortes. Dados que representam cerca de 14 milhões de casos a mais em comparação com as taxas de 2019 (17).

Apesar do aumento de casos, os resultados sugerem que os esforços dos países evitaram o pior cenário projetado no início da pandemia. Desde 2000, as mortes por malária diminuíram de forma constante de 896 mil para 562 mil em 2015 e para 558 mil em 2019. No entanto, em 2020, as mortes por malária tiveram um aumento de 12% em relação a 2019. Assim, estima-se que 47 mil (68%) dos 69 mil casos adicionais de mortes por malária foram em virtude das interrupções durante a pandemia. Destas, as 22 mil mortes restantes representam o aumento esperado entre 2019 e 2020 utilizando o método de estimativa de casos para a doença, na ausência de interrupções nos serviços de saúde (**Figura 1**) (17).

Dentre as espécies de protozoários causadores da malária humana, as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo, sendo responsáveis por 95% das infecções (18). Apesar dos esforços para eliminar a malária no mundo, a resistência dos principais agentes etiológicos aos antimaláricos aumentou consideravelmente nos últimos anos (19), o que tem permitido que a malária continue atingindo novas áreas e reapareça em locais onde a doença foi anteriormente considerada erradicada (20, 21).

A malária causada pelo *P. falciparum* é frequentemente considerada o principal alvo, pois é a espécie responsável pelo maior número de mortes dentre os casos de infecção. No entanto, a malária causada pelo *P. vivax* também causa sintomas graves e ocasionalmente morte (22), além de ser endêmica em diferentes regiões da América do Sul e América Central, em algumas partes da África e grande parte da Ásia. Segundo dados do último relatório mundial de malária, em 2020, cerca de 4,5 milhões dos casos de malária foram causados pelo *P. vivax* (17).

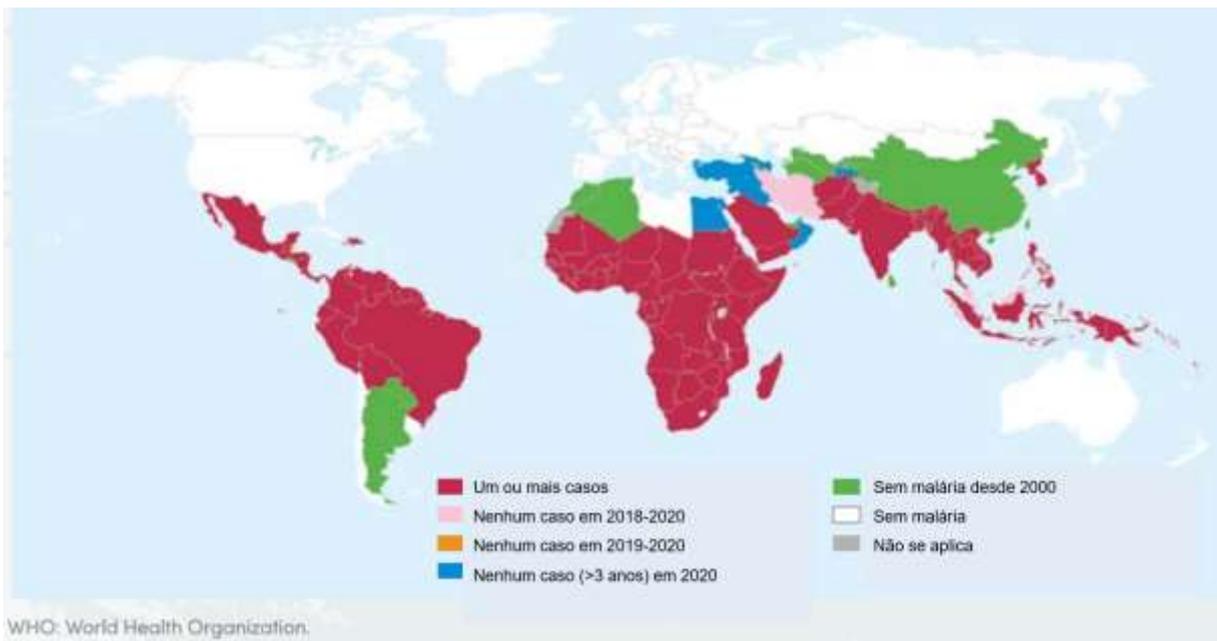


Figura 1 – Distribuição mundial de malária em 2000 e seu status até 2020.

Adaptado e traduzido. Fonte: WHO, 2021 (17).

São inúmeros os desafios que têm impactado na eficácia do controle da malária. Podem-se citar como exemplos os desafios operacionais: 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 de longa duração (LLIN - Long-Lasting Insecticide); 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 em áreas endêmicas; dentre outros (23). Além disso, existem os desafios biológicos que envolvem tanto o parasito quanto o vetor, dentre eles, os relatos crescentes de resistência aos antimaláricos e aos inseticidas (24). Diante da urgência de se desenvolverem novas ferramentas de diagnóstico como importantes aliadas ao controle, somada a todos estes desafios previamente citados, o ano de 2020 trouxe o que a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinou como a maior ameaça enfrentada até o momento para avançar na eliminação da malária: a pandemia de covid-19, oficialmente declarada em janeiro de 2020 como uma emergência mundial de saúde pública. A OMS 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,

como resultado de uma redução de 75% de medidas rotineiras de controle (redução da distribuição de LLIN e escassez de medicamentos) (25-27).

Além de todas estas questões observadas em um contexto mundial, ainda é necessário levar em conta algumas particularidades da malária em cada localidade, a fim de garantir a eficácia das diferentes medidas aplicadas. As espécies *P. falciparum* e *P. vivax*, consideradas as mais prevalentes no mundo e responsáveis pela maioria dos casos, possuem uma distribuição global bem diferenciada (18). A distribuição de *P. falciparum*, corresponde a aproximadamente 99,7% dos casos no continente Africano, enquanto o *P. vivax*, considerada a espécie plasmodial mais dispersa no mundo, é responsável por 76% dos casos nas Américas e também é a espécie predominante em regiões tropicais e temperadas (26, 28). Esse perfil se explica por características biológicas, como o desenvolvimento de hipnozoítos (formas latentes do parasito) e o tempo de incubação variável (29, 30). 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 (31, 32). O *P. vivax* é a única espécie, dentre as demais, cuja invasão de eritrócitos é quase que completamente dependente do antígeno do grupo sanguíneo-Duffy. Entretanto, existem alguns relatos descrevendo a ocorrência da infecção por *P. vivax* em certas regiões da África, onde os indivíduos aparentemente não possuem o antígeno Duffy, sugerindo que o parasito deve usar receptores alternativos para a invasão de eritrócitos ou que a população nessas regiões expressa baixos níveis do antígeno (33, 34). Nesse sentido, acredita-se que a mobilidade da população e o fluxo migratório, pode amplificar a heterogeneidade do fenótipo Duffy e aumentar a população de hospedeiros Duffy positivos (35). Apesar desta reconhecida importância epidemiológica, por vezes o *P. vivax* é deixado à sombra do *P. falciparum* diante do grande problema associado às formas graves da doença na África (36). Além destas espécies, o *P. malariae* é amplamente distribuído no globo terrestre, enquanto o *P. ovale* é encontrado na África e na Ásia, porém ambas as espécies apresentam prevalência no Oeste Africano (31).

1.3 A malária no Brasil

No Brasil, a transmissão de malária é classificada como instável e de baixa ou média intensidade, predominante na região amazônica e abrangendo cerca de 99% dos casos relatados do país (37). Destes, a maioria se encontra distribuída por 41 municípios presentes nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. 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. Na região extra-amazônica, em 2020, mais de 90% dos casos notificados foram importados de estados amazônicos endêmicos ou de outros países endêmicos como os do continente africano, porém são observados casos autóctones nessa região, principalmente em áreas de Mata Atlântica (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo) (1).

Em 2017 e 2018 houve um aumento expressivo de 50,5%, mais de 65 mil casos de malária a mais em relação a 2016, quando foram notificados 129.243 casos. Em 2020, o Brasil registrou um total de 145.188 casos de malária (**Figura 2**). Comparando com o ano de 2019, quando foram registrados 157.452 casos da doença, houve uma redução de 7,8%. Do total de casos registrados em 2020, 118.651 (75%) foram por *P. vivax*, sendo a espécie mais prevalente no país. Além disso, a letalidade por malária na região Amazônica é considerada relativamente baixa (1,7/10.000 habitantes) quando comparada a região extra-amazônica, na qual a letalidade chega a ser 100 vezes maior (1). O óbito nestas áreas ocorre, na maior parte, em pessoas que vêm infectadas de outros países ou de estados da região Amazônica, e não recebem o diagnóstico e o tratamento adequados devido à dificuldade na suspeita de uma doença incomum nestas áreas, somada à desinformação dos viajantes a respeito dos seus riscos.

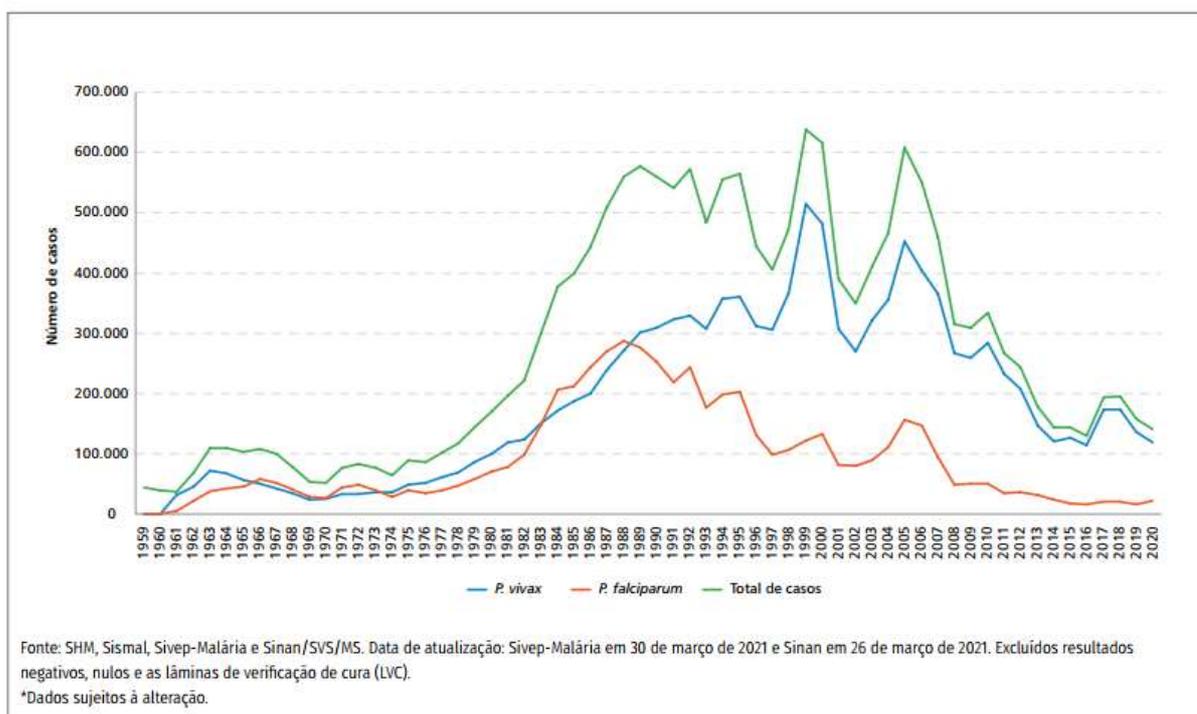
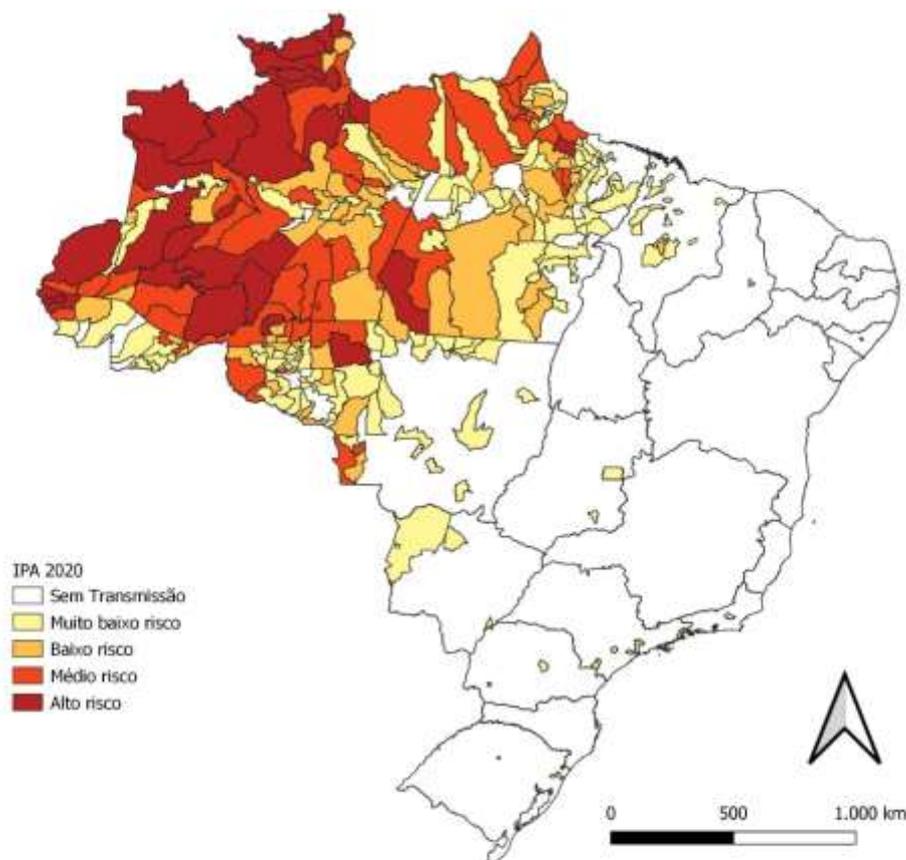


Figura 2 - Casos de malária notificados no Brasil, 1959 – 2020.

Fonte: Ministério da Saúde, 2021 (1).

O padrão de endemicidade da malária e o risco de contrair a doença é bem heterogêneo no Brasil. Esse risco é medido pela Incidência Parasitária Anual (IPA), calculada pelo número de casos ocorridos durante o ano em uma determinada área, dividido pela população sob o risco nesta área e expresso em casos por mil habitantes. A IPA é o indicador utilizado pelo Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) para realizar a estratificação epidemiológica de risco de transmissão, que classifica os municípios em locais de: muito baixo risco (IPA < 1 casos/1.000 habitantes); baixo risco (IPA entre 1 e 10 casos/1.000 habitantes); médio risco (IPA entre 10 e <50 casos/1.000 habitantes); e alto risco (IPA ≥ 50 casos/1.000 habitantes) (**Figura 3**). Em 2020, na região amazônica, 29 municípios foram classificados como de alto risco, 47 de médio risco, 54 de baixo risco e 128 municípios de muito baixo risco (1).



Classificação da IPA: Sem transmissão - 0 casos autóctones; Muito baixo risco - IPA <1 caso/1.000 habitantes; Baixo risco - IPA <10 casos/1.000 habitantes; Médio risco - IPA <50 casos/1.000 habitantes; Alto risco - IPA ≥50 casos/1.000 habitantes.

Data de atualização dos dados: 03 de agosto de 2021. Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan.

Figura 3 - Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2020.

Fonte: Ministério da Saúde, 2021 (1).

Apesar dos avanços significativos que sucederam a introdução do PNCM, ainda existem inúmeros desafios que têm impacto direto na eliminação da malária no Brasil (38, 39). Além da heterogeneidade, a sazonalidade da malária é diferente em cada estado da Amazônia e está relacionada com outros fatores que irão influenciar a proliferação de mosquitos como precipitação, temperatura, umidade e nível da água, propiciando picos sazonais de transmissão da malária no período de transição entre as estações úmida e seca. Dessa forma é comum observar surtos epidêmicos de acordo com as variações climáticas e socioambientais (39). Fatores socioeconômicos e ambientais como o fluxo migratório intenso e a ocupação desordenada nas áreas periurbanas, bem como o desmatamento para extração de madeira, também promoveram o agravamento e a manutenção da transmissão de malária nessa região (40).

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 um grande 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 (40, 41). Além destes, outros desafios são as infecções assintomáticas, onde há cerca de 50 anos já se descrevia que indivíduos assintomáticos poderiam atuar 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, locais adjacentes ao Brasil (42-45). Um obstáculo importante é a presença frequente de infecções submicroscópicas causadas por *P. vivax*. A baixa parasitemia encontrada nessas infecções dificulta a detecção dos parasitos pelos métodos usuais de diagnóstico, como a convencional microscopia amplamente empregada no país, fazendo com que os indivíduos infectados, e não tratados, atuem como reservatórios da doença e assim impactem diretamente no controle da malária (46). Outro desafio é a capacidade que a espécie predominante *P. vivax* possui de se manter sob a forma de hipnozoítos, 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 (47, 48).

O PNCM considera como uma recrudescência a recidiva (recorrência de parasitemia assexuada) que ocorre entre 7 a 28 dias após o início do tratamento de um caso de malária. Como recaída a recidiva que incide entre 29 e 60 dias, e como reinfeção o reaparecimento do parasito sanguíneo após 60 dias do tratamento. Relatos de emergência de *P. vivax* resistentes à cloroquina são uma realidade no país, com episódios de recrudescência descritos tanto em pacientes tratados com monoterapia de cloroquina ou em terapia combinada com primaquina (49-51). 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 causada por *P. vivax* (52). A terapia ineficaz devido à resistência causa um aumento da carga parasitária, prolongando a duração dos sintomas clínicos, aumentando a probabilidade de aparecimento de doenças graves e a probabilidade de transmissão

(35). Além disso, a primaquina é altamente tóxica para pessoas com deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD), por causar hemólise (53). Em virtude destas problemáticas, também se torna necessário reforçar os estudos para a utilização de novos fármacos contra o *P. vivax*.

1.4 Biologia do parasito

1.4.1 O ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

O ciclo biológico do *Plasmodium* é dividido em duas fases: a fase sexuada (esporogônica), que tem como hospedeiro a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, e a fase assexuada (esquizogônica), onde a multiplicação parasitária ocorre em hepatócitos e eritrócitos, no hospedeiro vertebrado (**Figura 4**) (54, 55).

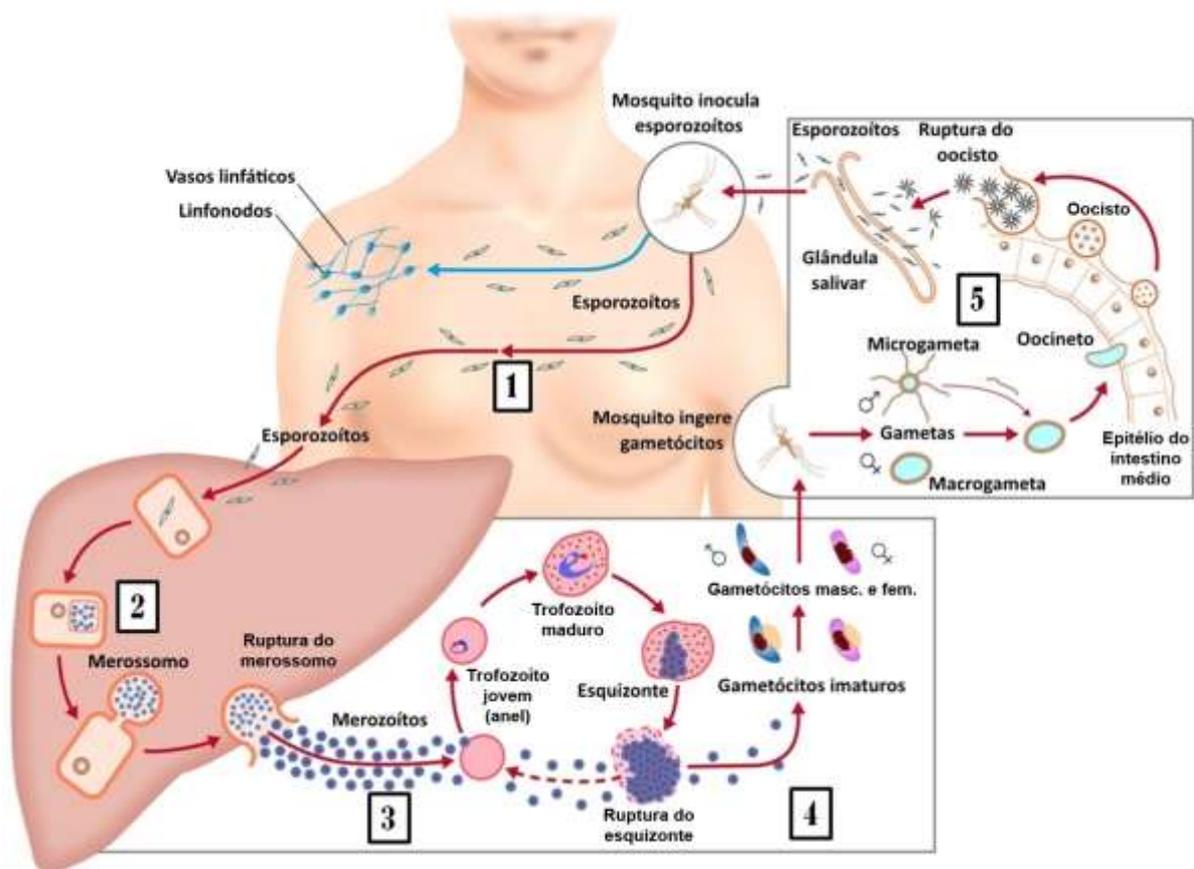


Figura 4 - Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado.

Fonte: Adaptado e traduzido de García-Basteiro *et al.* 2012 (56). (1) Esporozoítos após serem inoculados pelo mosquito vetor e migração na pele do hospedeiro vertebrado; (2) Fase pré-eritrocítica (hepática) e formação do merossomo; (3) Fase eritrocítica – merozoítos invadindo eritrócitos, com subsequente desenvolvimento intraeritrocítico; (4) Estágio sexual

do parasito (gametócitos) no hospedeiro vertebrado; (5) Ingestão dos gametócitos (formas infectantes) pelo inseto vetor e desenvolvimento do estágio sexuado em seu intestino médio.

No homem, o ciclo biológico do parasito se inicia durante o repasto sanguíneo de uma fêmea infectada, que inocula os esporozoítos (formas infectantes do parasito) na pele do hospedeiro, podendo permanecer neste local por algumas horas antes de encontrarem um vaso sanguíneo (57). Os esporozoítos são liberados principalmente na pele e não diretamente na corrente sanguínea, como se acreditou por muito tempo (58). Uma parte desses parasitos é drenada para os vasos linfáticos, atingindo os linfonodos, podendo se desenvolver como formas exoeritrocíticas (57). No entanto, apenas aqueles que atingem a circulação sanguínea são capazes de se desenvolverem e dar continuidade ao ciclo eritrocítico, enquanto os demais parecem atuar como uma fonte de antígenos para o sistema imune adaptativo (59, 60). Os esporozoítos que atravessam o endotélio e chegam à circulação sanguínea são transportados passivamente até o fígado, onde infectam os hepatócitos e iniciam o estágio hepático (pré-eritrocítico), no qual se aderem às células endoteliais dos sinusóides hepáticos e iniciam um processo de movimentação denominado *gliding*, “deslizando” até atravessarem a barreira sinusoidal (61).

A invasão do hepatócito pelo esporozoíto é complexa e envolve várias interações entre o parasito e a célula hospedeira. Uma vez no parênquima hepático, os esporozoítos migram ativamente, atravessando o citosol de vários hepatócitos antes de invadir aquele que será o seu local de desenvolvimento e replicação, através da formação de um vacúolo parasitóforo ao seu redor (62, 63). Essa intensa travessia por diversos hepatócitos parece ser um processo obrigatório para tornar os esporozoítos capazes de estabelecer a infecção nesta célula-alvo, sendo um passo essencial do ciclo de vida do *Plasmodium* (64). Algumas espécies como, o *P. vivax* e o *P. ovale* podem se desenvolver em formas latentes do parasito no fígado, denominadas hipnozoítos, que são responsáveis pela ocorrência de recaídas da doença (65).

Após a invasão bem sucedida do hepatócito e posterior formação de um vacúolo parasitóforo, o esporozoíto se diferencia de uma forma invasiva a uma forma ativa replicativa: o trofozoíto pré-eritrocítico (hepático). Uma vez diferenciado, o trofozoíto sofre sucessivas divisões pelo processo de esquizogonia, passando por

um rápido crescimento e replicação do DNA e de suas organelas, promovendo, dessa forma, o desenvolvimento de um sincício multinucleado, conhecido como esquizonte hepático (ou tecidual) (66). Após a maturação dos esquizontes, milhares de merozoítos são formados e ficam envoltos pela membrana plasmática dos hepatócitos, sendo denominados merossomos (67).

Posteriormente, ocorre a ruptura dos merossomos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e então aderem e invadem os eritrócitos rapidamente (68). Inicia-se então a fase eritrocítica do ciclo da malária, momento em que a sintomatologia característica ocorre. Os merozoítos apresentam, em sua região apical, estruturas como os micronemas e as roptrias que participam da invasão mediante o contato com os eritrócitos. Os micronemas contém 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 merozoítos replicarão gerando células-filhas (69). Este processo de invasão que inicia o ciclo eritrocítico envolve diversas etapas, como reconhecimento, reorientação apical e invasão, além de diversas interações entre as proteínas do parasito e os receptores eritrocíticos (69). Dentro dos eritrócitos, os merozoítos perdem suas organelas apicais, se diferenciam em trofozoítos jovens (formato em anel), trofozoítos maduros, esquizontes eritrocíticos, e, posteriormente, em merozoítos novamente (63). Com a ruptura das células sanguíneas, os merozoítos são liberados na circulação e iniciam novos ciclos contínuos de desenvolvimento nos eritrócitos, repetindo os processos de invasão, replicação, liberação e nova invasão, resultando assim nas manifestações clínicas da doença, principalmente os acessos febris característicos da malária (70).

Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, uma pequena parte destes parasitos se diferencia em estágios sexuais: os gametócitos femininos e gametócitos masculinos (71-73). Estas formas sexuais ao serem ingeridas pelo mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo dão início à fase sexuada do ciclo, que ocorre no interior do intestino médio do inseto vetor, formando gametas femininos e masculinos.

No intestino médio do inseto vetor, os gametócitos femininos se diferenciam em macrogametas e os masculinos em microgametas através do processo de exflagelação. Os gametas femininos são fecundados pelos gametas masculinos

formando o zigoto que sofre meiose completa e se transforma em uma estrutura invasiva móvel, denominada oocineto (71, 74). O oocineto atravessa a membrana peritrófica e o epitélio intestinal do mosquito, se alojando na membrana basal do órgão. Dessa maneira, ele perde a motilidade e adquire uma nova forma, denominada oocisto. Inicia-se uma intensa multiplicação assexuada (esporogonia) do parasito, envolvendo a replicação do DNA e divisões nucleares no interior de cada oocisto, no qual são formados milhares de esporozoítos (75). Em aproximadamente duas semanas, a parede do oocisto maduro se rompe liberando os esporozoítos na hemolinfa do inseto, que podem migrar até as glândulas salivares e serão armazenados até a sua inoculação no hospedeiro vertebrado, completando o ciclo evolutivo do *Plasmodium* (71, 76).

1.4.2 Particularidades do *Plasmodium vivax*

Diferenças significativas são observadas entre a infecção causada por *P. vivax* e *P. falciparum*, quanto ao tipo de célula infectada e as interações ligante-receptor que ocorrem durante o processo de invasão do eritrócito. Enquanto o *P. falciparum* invade eritrócitos maduros, o *P. vivax* apresenta uma preferência por eritrócitos jovens, os reticulócitos, um mecanismo que ainda não é bem elucidado, uma vez que ainda não existe um sistema de cultivo *in vitro* estabelecido para esta espécie. No entanto, o papel que a família das proteínas ligadoras de reticulócitos (Reticulocyte Binding Protein, RBP) apresenta durante o processo de invasão de reticulócitos já é bem descrito na literatura científica e essa preferência do *P. vivax* tem impacto direto na dinâmica da infecção (77). Enquanto o *P. falciparum* modifica intensamente a superfície dos eritrócitos infectados, promove a citoaderência ao endotélio por meio da ação de proteínas como a Proteína 1 de Membrana de Eritrócitos de *P. falciparum* (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1, PfEMP1) e causa quadros de malária grave como a malária cerebral, o *P. vivax* raramente está associado a quadros severos. No entanto, infecções causadas por *P. vivax* associadas à presença de comorbidades podem levar a complicações e até mesmo ao óbito (78, 79).

Tanto o *P. vivax* como o *P. ovale*, são capazes de desenvolver os hipnozoítos, que podem permanecer dormentes por semanas ou meses e gerar recaídas. Esta

forma do parasito é responsável pelo surgimento de um novo ciclo hepático seguido de fase eritrocítica, sem que haja uma reinfecção (80, 81). Apesar do mecanismo de ativação dos hipnozoítos ainda não estar completamente elucidado, é essencial que a ativação ocorra em um momento oportuno, permitindo assim a transmissão ao mosquito vetor, bem como a posterior transmissão a um novo hospedeiro, garantindo a manutenção da espécie (82).

Outra particularidade encontrada é na gametogênese: enquanto o *P. falciparum* é capaz de se diferenciar relativamente mais tarde durante o estágio sanguíneo, o *P. vivax* é capaz de produzir gametócitos maduros significativamente mais cedo, cerca de 8 dias após a inoculação de esporozoítos pelo mosquito vetor, favorecendo intensamente a sua transmissão (83, 84). As densidades dos gametócitos aumentam continuamente acompanhando a evolução da infecção sanguínea, em intervalos de aproximadamente 5 dias, favorecendo sua transmissão ao mosquito vetor. Essa capacidade de gerar gametócitos antecipadamente e continuamente, somada às recaídas causadas por hipnozoítos 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 livres e capazes de circular sem citoaderência significativa, aumentando assim as suas chances de transmissão (84, 85). Mais uma vantagem intrínseca sugerida na literatura é a de que os gametócitos de *P. vivax* conseguem promover a infecção no vetor com níveis menores de gametócitos em comparação ao *P. falciparum*, que somada às características anteriores indicam uma transmissão muito mais eficiente (85, 86).

Os episódios de recaídas promovidos pelos hipnozoítos podem levar à malária crônica, com sintomas relevantes como anemia severa, desnutrição, predisposição a coinfeções e resposta imunológica debilitada (79, 87, 88). Nesse contexto, a capacidade do *P. vivax* de produzir hipnozoítos somada ao seu elevado potencial transmissor - garantido por características como a produção antecipada e contínua de gametócitos com um ciclo mais curto no mosquito vetor, quando comparada com outras espécies como *P. falciparum* - caracteriza essa espécie como uma das mais difíceis de eliminar (89, 90). Além disso, a predominância do *P. vivax* em algumas das regiões mais densamente povoadas e pobres do mundo também demonstra a

importância de reverter a negligência histórica em relação à essa infecção (35). Todos esses aspectos da biologia dessa espécie representam importantes desafios para o controle e eliminação da malária vivax (89). Dessa forma, a melhor compreensão de sua biologia, bem como saber como ela difere do *P. falciparum* é uma necessidade de suma importância para que possa ocorrer um melhor direcionamento das pesquisas e intervenções a fim de intensificar o controle da doença (91).

1.5 Diversidade genética e estrutura populacional do *Plasmodium vivax*

As informações disponíveis a respeito da diversidade genética e da história evolutiva do *P. vivax* são mais escassas quando comparadas com as do *P. falciparum*. Isso se deve, principalmente, à menor mortalidade associada à infecção causada pelo *P. vivax* e à ausência de um sistema eficiente de cultivo contínuo desse parasito (92). No entanto, nos últimos anos, muitos estudos sobre o *P. vivax* têm contribuído para um melhor entendimento dessa espécie.

Estudos de inferência acerca da diversidade genética de populações e genes dos parasitos da malária são importantes para o monitoramento de estratégias de controle, identificação de novos fármacos e alvos vacinais, bem como para a compreensão do padrão de virulência e da interação parasito-hospedeiro (93). Além disso, os estudos de estrutura genética revelam como a variação genética está distribuída dentro e entre populações e espécies, além de auxiliar na melhor compreensão da dinâmica populacional.

Nesse sentido, duas abordagens complementares têm sido empregadas no estudo de genética de população e da variabilidade genética do *Plasmodium*. Uma dessas abordagens tem como objetivo compreender a estrutura genética das populações do parasito, como por exemplo, a partir do estudo da distribuição espacial dos alelos, da ocorrência de migrações e das estratégias de reprodução. Outra abordagem consiste na análise da diversidade genética de genes específicos, como os genes que codificam antígenos vacinais e genes associados à resistência aos fármacos. As análises de genes específicos fornecem informações importantes sobre como os diferentes alelos são gerados e mantidos na população, podendo também determinar o papel da recombinação genética e seleção natural na geração e manutenção dos polimorfismos observados (94).

Diferentes marcadores moleculares são utilizados para a investigação da variabilidade genética e estrutura populacional de *P. vivax*. Os principais utilizados são os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) em genes codificadores de antígenos (92). Os SNPs têm taxas de mutação mais lentas que os microssatélites (sequências simples de DNA repetidas em tandem), sendo, dessa forma, os marcadores mais desejáveis para análises genéticas de populações em amplas escalas geográficas (95).

Um estudo realizado por Neafsey e colaboradores, em 2012, utilizando sequenciamento genético comparou o genoma de cepas de *P. vivax*, de localidades geográficas distintas, e de *P. falciparum*. Dentre os genomas analisados estavam presentes os das cepas de referência de cada espécie, Salvador-1 (*P. vivax*) e 3D7 (*P. falciparum*), e foi observado aproximadamente o dobro da quantidade de SNPs em *P. vivax* que em *P. falciparum* (96). Além disso, a maioria dos estudos genéticos populacionais tem demonstrado uma alta diversidade genética nas populações de *P. vivax* quando comparada com as de *P. falciparum* (92, 97), mesmo em áreas de baixa transmissão (96, 98, 99). Como muitos desses genes codificam proteínas que são candidatas à vacina antimalárica, a análise da variabilidade, bem como o melhor entendimento da origem dos polimorfismos presentes nesses genes que as codificam, são essenciais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (100).

Diferentes fatores evolutivos e demográficos, como mutação, recombinação, seleção natural, fluxo gênico e estrutura geográfica das populações do parasito são responsáveis por modelar o padrão de diversidade genética observado nas sequências de DNA e proteínas (93). Para os antígenos da malária, é comumente observado o papel da recombinação e da seleção natural na geração e manutenção da diversidade genética (94, 101).

A recombinação meiótica é uma importante fonte de diversidade genética, podendo substituir vários nucleotídeos, ao mesmo tempo, em um único evento. Dessa maneira, a recombinação é capaz de gerar novas variantes alélicas, que permitem ao parasito escapar da resposta imune do hospedeiro induzida por variantes do mesmo antígeno em exposições anteriores (101). Para o *P. falciparum* e o *P. vivax*, a maioria dos estudos que faz inferências sobre a recombinação utiliza SNPs em genes que codificam antígenos vacinais, como o Antígeno de Membrana Apical-1 (Apical Membrane Antigen-1, AMA-1) e a Proteína de superfície do merozoíto-1 (Merozoite Surface Protein-1, MSP-1). Nesses trabalhos, a

recombinação tem sido frequentemente associada à elevada diversidade genética observada nos genes que codificam esses antígenos (102-104).

As infecções por *P. vivax* comumente contêm múltiplos clones de parasitos geneticamente distintos que podem surgir a partir de uma única picada do inseto vetor, carregando uma mistura de parasitos, ou então a partir da inoculação por diferentes mosquitos portadores de variantes genéticas de parasitos (105, 106). A ingestão de variantes geneticamente distintas pelo mosquito durante o repasto sanguíneo pode aumentar a diversidade genética através da recombinação meiótica (95). Além disso, as recidivas da infecção por *P. vivax* devido à reativação de hipnozoítos podem contribuir para o aumento da diversidade parasitária (107). Os hipnozoítos oriundos de infecções anteriores podem se acumular nos hepatócitos e serem ativados simultaneamente no momento da nova infecção resultando na co-circulação de cepas diferentes. Acredita-se que, quando dois ou mais clones geneticamente distintos estão presentes no mesmo hospedeiro, a competição dentro do hospedeiro pode selecionar características de *P. vivax* que representam grandes desafios à saúde pública, como aumento da virulência, aumento da transmissibilidade e resistência aos medicamentos antimaláricos (106).

A seleção natural, assim como a recombinação, podem exercer forte influência na evolução dos parasitos da malária, principalmente através da pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro e pelos fármacos antimaláricos (108). A diversidade observada nos genes codificadores de antígenos, principalmente do esporozoíto e merozoíto, é comumente atribuída à pressão seletiva imposta pelo sistema imune. Esses genes acumulam mutações, o que é favorecido pela seleção natural positiva, que impedem o reconhecimento do parasito pelo sistema de defesa do hospedeiro. Como consequência, uma alta diversidade genética é mantida pela seleção natural positiva, frequentemente com um excesso de mutações não sinônimas que resultam na substituição do aminoácido (109). Diferentes estudos têm demonstrado a influência da seleção natural positiva no padrão de diversidade genética dos antígenos do plasmódio, como a AMA-1, MSP-1 e EBA-175 (101, 102, 110).

1.6 Diversidade genética e resposta imune

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* (111). Nesse sentido, apesar do papel bem estabelecido da imunidade inata e adaptativa na proteção contra os plasmódios, muitos estudos têm buscado constantemente a caracterização de antígenos candidatos a vacinas que induzam níveis elevados de anticorpos protetores (112).

A diversidade genética de um antígeno candidato vacinal torna-se relevante quando se busca uma resposta imune protetora eficiente. A variabilidade genética confere ao parasito a capacidade de evadir a resposta imune pois gera variantes antigênicas dificultando o seu reconhecimento pelo hospedeiro. A expressão de proteínas de *P. vivax* com alto grau de polimorfismo e a resposta imune específica da cepa correspondente representam um importante obstáculo no desenvolvimento de vacinas (113, 114). Nesse sentido, a alta diversidade antigênica do parasito é um dos fatores que pode explicar o lento desenvolvimento da imunidade adquirida naturalmente (115). Dessa forma, a exposição repetida ao antígeno ao longo de vários anos é necessária para gerar um grande repertório de anticorpos contra diferentes sorotipos em uma área endêmica de malária (116). Em áreas endêmicas, os indivíduos são naturalmente expostos e, portanto, produzem respostas imunológicas específicas contra várias cepas. A imunogenicidade adquirida é geralmente de curta duração, específica da cepa e desenvolvida gradualmente após repetidas infecções (116, 117). Essa imunidade pode conter a parasitemia, protegendo o indivíduo contra doenças graves e diminuindo o risco de mortalidade.

A diversidade genética apresenta um grande desafio no desenvolvimento de vacinas, visto que a resposta imune induzida por vacinas precisa atuar amplamente contra diferentes variantes polimórficas ou alelos para prevenir o escape vacinal (118, 119). Evidências já demonstraram que o *P. vivax* pode usar diferentes vias de invasão, assim como o *P. falciparum*, o que pode contribuir de forma semelhante para a evasão imunológica e precisa ser considerado nos estudos sobre vacina (120, 121). Dessa forma, ao projetar e testar antígenos candidatos vacinais, é importante considerar a diversidade genética parasitária em todos os estágios de desenvolvimento da vacina e o uso de dados genômicos disponíveis (122).

Por fim, o conhecimento da extensão da diversidade genética permite prever um padrão de surgimento e disseminação de fenótipos de novas variantes

antigênicas que levam à resistência aos medicamentos, ao escape da imunidade induzida pela vacina ou ao desenvolvimento da malária vivax grave (123, 124).

1.7 Diagnóstico laboratorial de malária

O diagnóstico rápido e eficiente das infecções por *Plasmodium* constitui um dos pilares do PNCM, já que a adoção de tratamento apropriado depende da identificação precoce da espécie do parasito. Nesse contexto, alguns métodos são utilizados atualmente para o diagnóstico das diferentes espécies de *Plasmodium*, incluindo técnicas imunocromatográficas, moleculares e microscópicas, sendo esta última ainda considerada como referência na rotina laboratorial (125, 126).

A técnica da gota espessa por meio da microscopia óptica é o método oficialmente adotado no Brasil para o diagnóstico de malária. Mesmo após o avanço de técnicas diagnósticas, a gota espessa continua sendo um método simples, de baixo custo e de fácil realização. Essa técnica baseia-se na visualização do parasito por meio de microscopia óptica, após coloração com azul de metileno e Giemsa. Considerada padrão-ouro pela OMS, ela permite a diferenciação específica dos parasitos, a partir da análise de sua morfologia e dos seus estágios de desenvolvimento encontrados no sangue periférico (126). No entanto, as limitações da microscopia de rotina têm se tornado cada vez mais evidentes, principalmente em situações de coinfeções e de baixa parasitemia (127). Estudos já demonstraram que indivíduos portadores de parasitemia submicroscópicas, detectáveis apenas por métodos mais sensíveis, como os moleculares, podem ser capazes de transmitir malária, atuando como reservatórios da doença (83, 85).

Métodos complementares à microscopia óptica de rotina são os ensaios imunocromatográficos em papel, denominados testes de diagnóstico rápido (TDRs). São realizados em fitas de nitrocelulose contendo anticorpo monoclonal contra antígenos específicos do parasito. Grande parte dos testes hoje disponíveis discrimina, especificamente, o *P. falciparum* das demais espécies. Atualmente, o PNCM utiliza para o diagnóstico de malária o SD-BIOLINE MALARIA AG Pf/Pf/Pv, que é um teste combinado contendo a Proteína Rica em Histidina-2 (HRP2) e Lactato Desidrogenase do parasito (pLDH) de *P. falciparum* e pLDH de *P. vivax*. Por sua praticidade, menor custo e facilidade de realização, se tornou uma boa ferramenta para auxiliar no diagnóstico de malária. No entanto, o seu uso está

restrito a situações onde não é possível a realização do exame da gota espessa por microscopista certificado e com monitoramento de desempenho, como em áreas muito distantes e de difícil acesso aos serviços de saúde (125, 126). A qualidade diagnóstica de um TDR depende da experiência do examinador e dos cuidados de como ele é preparado e interpretado. A execução e a acurácia dos TDRs podem ser afetados por diferentes fatores, como problemas na fabricação do teste, condições de armazenamento e transporte, competência e desempenho do manipulador (128, 129). Além disso, assim como a microscopia, os TDRs apenas detectam de forma confiável de 50-100 parasitos/ul (130, 131), sendo necessário associá-los a outras técnicas em áreas onde há a circulação de mais de uma espécie de plasmódio, devido a sua incapacidade de diferenciá-las (132, 133) e ainda podem gerar falsos positivos devido à persistência do HRP-2 após uma infecção (134).

Devido, principalmente, à sua alta sensibilidade, o uso de ferramentas moleculares no diagnóstico de malária tem se tornado cada vez mais importante, sobretudo em áreas prestes a alcançar a eliminação da doença ou em regiões endêmicas onde os indivíduos apresentam baixas parasitemias (135). Dentre as ferramentas moleculares atualmente disponíveis para o diagnóstico e estudo da doença destacam-se protocolos baseados na amplificação de DNA do parasito, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como a Nested-PCR e a PCR em tempo real (qPCR) (136-138). Já foi demonstrado que técnicas de PCR são mais sensíveis e específicas quando comparadas às técnicas microscópicas e ao teste imunocromatográfico, tendo grande importância na diferenciação da espécie de *Plasmodium* em pacientes com baixa parasitemia e em infecções mistas (127, 139). Nesse sentido, o diagnóstico molecular para malária tem apresentado um grande progresso. O PNCM, baseado em estudos realizados no Brasil e em vários países do mundo, considera que pacientes com PCR positivo para malária, mesmo assintomáticos, podem infectar mosquitos e/ou se tornar sintomáticos, sendo assim devem ser tratados quando o diagnóstico for realizado unicamente por essa técnica molecular (126). No entanto, em virtude do seu custo elevado, da necessidade de infraestrutura e profissionais capacitados, seu uso ainda é limitado aos laboratórios de referência, sendo muito importante no auxílio diagnóstico, bem como em estudos epidemiológicos e de vacinas.

1.8 Estratégias de controle da malária

As atuais políticas estratégicas para o controle de malária são baseadas na prevenção, através do controle vetorial, e no gerenciamento de casos, reduzindo a morbidade e a mortalidade por malária. De acordo com a OMS, no Brasil, a estratégia de controle da doença é composta por três pilares principais: o diagnóstico rápido por meio do exame de gota espessa; o tratamento quimioterápico dos indivíduos positivos; e a redução do contato com os mosquitos vetores, pela utilização de mosquiteiros impregnados e a borrifação domiciliar de inseticidas (140).

O tratamento adequado tanto previne a ocorrência de casos graves e fatais, como elimina fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença. Para cada espécie de *Plasmodium* é utilizado um medicamento ou associações de medicamentos específicos, em dosagens adequadas à situação particular de cada paciente. A OMS, bem como o PNCM estabelecem uma lista de fármacos e suas respectivas dosagens a serem administradas, sendo classificados de acordo com a sua natureza química (1).

A dificuldade no controle da malária, no entanto, ocorre devido à grande complexidade do ciclo biológico do parasito, à resistência aos inseticidas e aos medicamentos antimaláricos, bem como às infecções assintomáticas e submicroscópicas. Há também outros desafios biológicos como: deleções do gene *pfhrp2/3* entre alguns parasitos da malária, que causam resultados de TDRs falsos negativos, complicando o gerenciamento e controle de casos; e a propagação de espécies de anofelinos invasores (não nativos), que representam uma ameaça potencial para o controle da malária (17). Além de todas essas questões, a imunidade naturalmente adquirida pela exposição à malária não é eficaz e de curta duração. Tais informações tornam necessárias outras estratégias efetivas de controle (141, 142), como o desenvolvimento de uma vacina.

1.9 A busca por uma vacina antimalárica

Um dos maiores desafios da medicina tem sido o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura contra a malária. Apesar de todos os avanços obtidos após anos de pesquisa em vacinas contra a malária, os esforços permanecem contínuos e árduos, requerendo longos períodos de ensaios laboratoriais e clínicos, e sempre exigindo um amplo suporte financeiro (143). Uma vacina antimalárica segura, efetiva

e acessível causaria um grande impacto no controle da doença e seria essencial para a sua possível eliminação.

Contudo, alguns obstáculos ainda devem ser superados. A dificuldade para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica reside na complexidade do parasito, seu ciclo evolutivo, a limitada compreensão das interações parasito-hospedeiro e a diversidade genética nas populações do *Plasmodium* (144, 145). Além disso, a recombinação que ocorre na gametogênese também pode ocasionar o aumento significativo de variabilidade antigênica facilitando a evasão do parasito do sistema imunológico do hospedeiro (144). Durante o ciclo evolutivo, os plasmódios passam por diferentes estágios de desenvolvimento, expressando uma variedade de antígenos característicos de cada fase, capazes de induzir respostas imunes distintas (146). Dessa forma, essa grande complexidade trouxe diversos antígenos candidatos promissores a compor uma vacina antimalárica capaz de induzir uma resposta imune protetora.

Apesar de todos os obstáculos existentes, alguns fatos mostram que o desenvolvimento de uma vacina antimalárica é possível. A malária não gera uma imunidade estéril (grau máximo de proteção) e duradoura (147), entretanto, indivíduos residentes em áreas endêmicas, após sucessivas e múltiplas infecções, desenvolvem uma imunidade clínica, na qual a replicação parasitária é controlada (148, 149). Além disso, já foi visto que a transferência de imunoglobulinas de indivíduos imunes para indivíduos não imunes, diminui a parasitemia e as manifestações clínicas (145). A imunização de camundongos (150), primatas não humanos (151) e humanos (152) com esporozoítos irradiados promoveu a proteção contra o desafio com esporozoítos não irradiados, evidenciando a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina.

O ciclo biológico de *Plasmodium* spp. é complexo e rico em diversidade antigênica, o que explica a existência de diferentes estratégias vacinais voltadas para as formas e antígenos específicos do parasito em seus diferentes estágios de desenvolvimento. Nesse sentido, as vacinas podem ser projetadas para atingir o parasito em vários estágios de seu ciclo de vida e atualmente existem basicamente 3 estratégias vacinais: as vacinas pré-eritrocíticas, vacinas eritrocíticas e vacinas bloqueadoras de transmissão (153). Além disso, um fator importante a se considerar é se a vacina tem como alvo o parasito em um compartimento extra ou intracelular, uma vez que a imunidade protetora dependerá de anticorpos ou linfócitos citotóxicos, respectivamente.

A complexidade de desenvolver uma vacina antimalárica reside na dificuldade de encontrar um candidato vacinal ou a combinação de antígenos candidatos vacinais de vários estágios do ciclo que irão induzir uma resposta imune robusta e duradoura. A grande maioria dos antígenos candidatos estudados, apesar de serem muito imunogênicos também são altamente polimórficos, bem como os que são altamente conservados tendem a ser menos imunogênicos ou a não induzir uma alta titulação de anticorpos. Felizmente nos últimos anos houve um progresso significativo em identificar e caracterizar novos antígenos potencialmente candidatos a compor uma vacina antimalárica, presentes em diversos estágios do ciclo de vida do parasito, importantes no seu desenvolvimento e sobrevivência (153).

Segundo a iniciativa de desenvolvimento de vacinas criada pela OMS, atualmente, além da vacina RTS,S/AS01, há cerca de 23 formulações vacinais em ensaios clínicos e 17 em ensaios pré-clínicos contra o *P. falciparum*. Por outro lado, quando tratamos de pesquisas direcionadas ao *P. vivax*, o número de formulações em ensaios clínicos e pré-clínicos é bastante reduzido a 3 formulações: (1) ChAd63/MAV PvDBP, que tem como alvo a proteína que se liga ao antígeno Duffy de *P. vivax*, e é hoje a única formulação vacinal contra esta espécie em ensaios clínicos; (2) VMP002, que contém a PvCSP expressa em *Escherichia coli*; e (3) PvSPZ, composta por esporozoítos atenuados (**Figura 5**) (154).

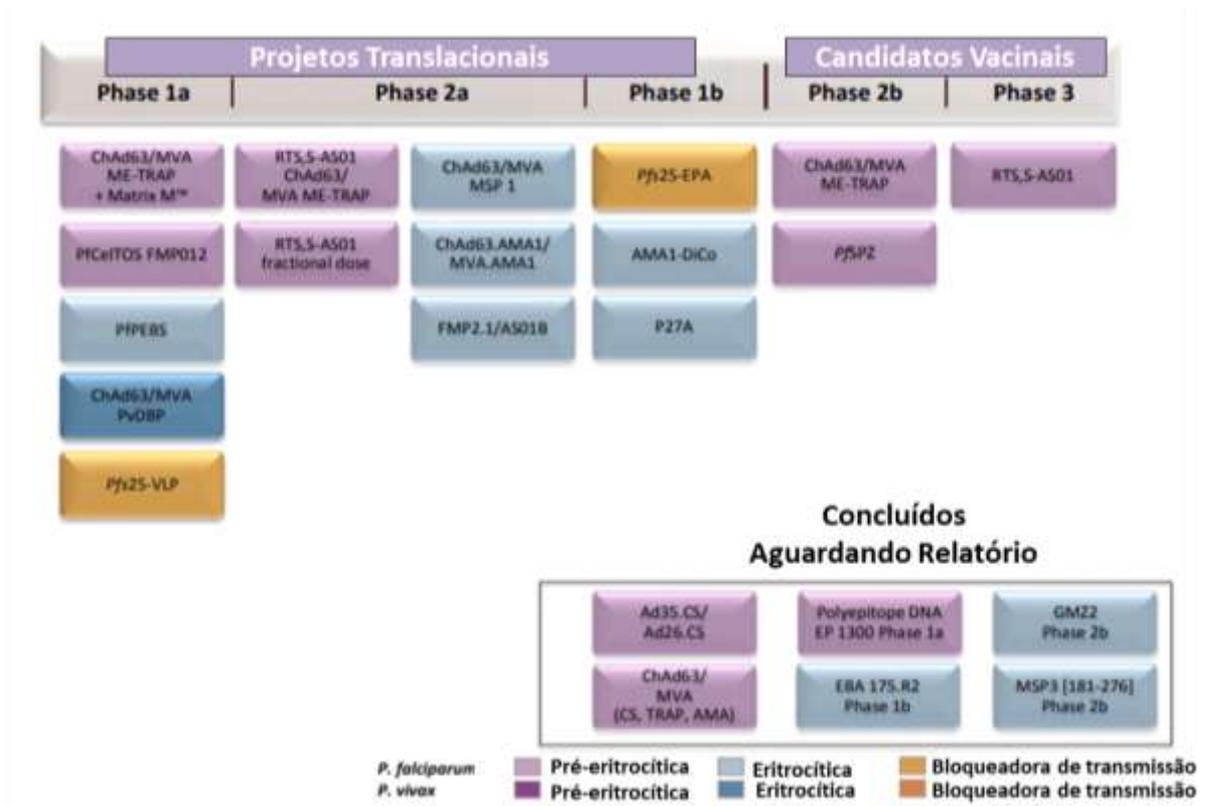


Figura 5 - Panorama global de vacinas antimaláricas atualmente em ensaios clínicos.

Fonte: Adaptado e traduzido de OMS, 2017 (154).

1.9.1 Vacinas pré-eritrocíticas

Têm como alvo os esporozoítos e estágios hepáticos ou hepatócitos infectados, e visam prevenir o estabelecimento da infecção, interrompendo a progressão desse estágio (155). Essas vacinas têm como objetivo induzir uma resposta de anticorpos contra os esporozoítos e, assim, impedir a entrada e o desenvolvimento de esporozoítos nos hepatócitos ou estimular uma resposta de células T que destruiriam os hepatócitos infectados (145, 155). Uma vacina pré-eritrocítica com uma alta eficácia poderia eliminar os parasitos pré-eritrocíticos antes de serem eliminados na corrente sanguínea. São também chamadas de vacinas anti-infecção (155). Em função do baixo número de esporozoítos liberados durante o repasto sanguíneo, este estágio representa atualmente o principal alvo vacinal contra o *Plasmodium* (156). Entretanto, uma vacina pré-eritrocítica precisa ser 100% efetiva, uma vez que, em virtude de sua elevada taxa de replicação, um pequeno número de esporozoítos é o suficiente para que a infecção atinja o estágio eritrocítico (157, 158).

Um exemplo de vacina com essa abordagem é a RTS,S/AS01 (nome comercial *Mosquirix*). Atualmente é a primeira e única vacina que alcançou ensaios clínicos de fase III e recentemente, no mês de outubro de 2021, a OMS aprovou o amplo uso entre crianças na África Subsaariana e em outras regiões com transmissão de moderada a alta de malária por *P. falciparum*. Essa vacina tem como alvo a proteína circunsporozoíta (CSP) que recobre a superfície do esporozoítio no estágio pré-eritrocítico (159). É constituída por 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 (160-162). Esta vacina foi desenvolvida em 1987, em uma parceria entre a GlaxoSmithKline e o Walter Reed Army Institute of Research, e participa atualmente de ensaios clínicos de fase 3, nos quais foi demonstrada uma eficácia aproximada de 36% em crianças de 5 a 17 meses que receberam 4 doses desta vacina (163-165). Tais resultados garantiram que a RTS,S/AS01 além de ser a primeira vacina antimalárica a passar por ensaios clínicos de fase 3, também tivesse a implementação piloto de forma emergencial no ano 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* (159, 166).

O progresso com a RTS,S/AS01 representa um marco histórico no desenvolvimento de vacinas antiparasitárias, mas a sua eficácia parcial ainda deixa espaço para melhorias. Estudos de novos antígenos candidatos vacinais têm como objetivo alcançar uma melhor eficácia para prevenir a malária clínica em crianças africanas. Em paralelo, outros estudos procuram diferentes indicações na prática clínica, como proteger mulheres grávidas da malária ou interromper o ciclo de transmissão do parasito e, assim, contribuir para a eliminação regional da malária, bloqueando a infecção por *P. falciparum* ou a transmissão aos mosquitos (155). Apesar da queda da eficácia ao longo do tempo, essa vacina ainda demonstra um claro benefício no cenário atual.

Outra abordagem é melhorar a imunogenicidade das vacinas baseadas em CSP. Recentemente uma nova proteína candidata vacinal vem se mostrando como a grande promessa na luta contra malária. A R21/MM é uma candidata vacinal pré-eritrocítica que consiste no antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg) fusionado

com a região C-terminal e central repetida da CSP. É a primeira vacina antimalárica em potencial a registrar uma eficácia de 77% na população-alvo de crianças africanas ao longo de 12 meses de acompanhamento. Atualmente a fase II dos ensaios clínicos está em andamento a fim de acompanhar a segunda temporada de malária após a dose de reforço ter sido aplicada. Essa etapa é crucial e permitirá a determinação da durabilidade da eficácia dessa vacina. A fase III do ensaio clínico já está planejada e será realizada em 5 países africanos que apresentam diferentes níveis de transmissão. Esse projeto está caminhando com o objetivo de licenciar uma vacina segura, de baixo custo e com alta eficácia (167).

1.9.2 Vacinas eritrocíticas

São também chamadas de vacinas de estágio sanguíneo. Têm como alvo os merozoítos e formas assexuadas do parasito que passam por ciclos multiplicativos e repetidos no interior dos eritrócitos. Visam impedir a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos e a sua multiplicação na circulação, a fim de prevenir a doença e suas complicações clínicas (155). O ponto chave da imunidade do estágio eritrocítico são os anticorpos, que têm como alvo as formas sanguíneas do parasito. Nesse sentido, sabendo-se que um certo nível de imunidade é adquirido após sucessivas infecções em área endêmicas (168), pode ser possível mimetizar e acelerar esse processo de imunidade naturalmente adquirida através de vacinas contendo proteínas presentes na superfície do merozoíto e envolvidas no processo de invasão ao eritrócito. Espera-se que uma vacina de estágio sanguíneo seja capaz de eliminar ou reduzir de forma significativa a carga parasitária e, conseqüentemente, os sintomas clínicos. Essa vacina seria capaz de induzir a produção de anticorpos que promoveriam a opsonização e destruição dos merozoítos e eritrócitos infectados. Além disso, poderia também, bloquear a adesão de eritrócitos parasitados às células endoteliais, que está associada ao desenvolvimento de malária grave (153, 169), tendo um grande impacto na morbidade e mortalidade em áreas endêmicas.

Outra abordagem em potencial se baseia no desenvolvimento de uma vacina contra toxinas, denominada vacina anti-doença, visto que não age sobre o desenvolvimento do parasito, mas somente das manifestações clínicas. Uma vacina capaz de bloquear as toxinas liberadas pelos parasitos poderia minimizar ou até mesmo evitar os sintomas da malária e, conseqüentemente, os casos mais graves

da doença, como a malária cerebral ou malária placentária. No entanto, esse tipo de vacina se destina a ser utilizado em uma estratégia conjunta com uma vacina antiparasitária (170).

1.9.3 Vacinas bloqueadoras de transmissão

Têm como alvo as formas sexuais do parasito, presentes tanto no hospedeiro humano como no mosquito vetor: gametócitos, gametas, zigoto e oocineto. Visam impossibilitar a transmissão da malária interrompendo o ciclo de vida do parasito no mosquito (171), induzindo anticorpos que bloqueiam a fertilização dos gametas no intestino do mosquito ou o desenvolvimento posterior do zigoto em esporozoítos, impedindo que os mosquitos se tornem infectantes (172).

Os anticorpos seriam ingeridos pelo mosquito no momento do repasto sanguíneo e impediriam o desenvolvimento parasitário dentro do intestino da fêmea do inseto vetor. Assim, prevenindo a fertilização e levando a falha na produção de esporozoítos, culminando na redução do potencial de transmissão do mosquito para o próximo hospedeiro humano. Esse tipo de vacina também é chamado de “vacina altruísta” ou “vacina solidária”, pois não confere proteção diretamente para o indivíduo vacinado, mas sim na população receptora, já que reduziria a transmissão no local. No entanto, essa vacina precisaria ser aplicada em toda população para efetivamente bloquear a transmissão (173).

Os desafios atuais no desenvolvimento de uma vacina bloqueadora de transmissão (TBVs) incluem a obtenção de respostas adaptativas suficientes que mantenham altos níveis de anticorpos ao longo do tempo, bem como uma ampla cobertura para atingir a imunidade coletiva. Assim como a vacina anti-doença, as TBVs podem ser implementadas em combinação com uma vacina pré-eritrocítica para prevenir a infecção em humanos e a transmissão para os mosquitos, bem como também podem ser combinados de forma semelhante com as vacinas eritrocíticas que reduzem a transmissão para avaliar a atividade aditiva ou sinérgica (155).

1.10 Principais antígenos candidatos vacinais

A habilidade que o *Plasmodium* tem de primeiro reconhecer e, então, invadir as diferentes células hospedeiras no homem, como os hepatócitos e as hemácias, bem como as células epiteliais no inseto vetor, é fundamental para o desenvolvimento do seu ciclo de vida. Nesse contexto, alguns antígenos localizados na superfície do parasito ou, especificamente, no interior de suas organelas apicais têm sido caracterizados, levando à uma melhor compreensão do ciclo biológico do *Plasmodium* e, conseqüentemente, à identificação de possíveis alvos que possam ser explorados em uma vacina contra a malária (174).

Dentre os antígenos candidatos vacinais de estágio pré-eritrocítico destacam-se alguns como a proteína CSP, proteína mais abundante presente na superfície dos esporozoítos e que atua diretamente na interação entre o parasito e as glândulas salivares do mosquito vetor, assim como no polo basolateral da membrana dos hepatócitos (175, 176). Conforme já descrita aqui anteriormente, esta proteína compõe a RTS,S/AS01, vacina atualmente desenvolvida para a malária causada por *P. falciparum*, como também compõe a proteína candidata vacinal R21/MM. Outro antígeno amplamente investigado é a Proteína Adesiva Relacionada à Trombospondina (Thrombospondin-Related Anonymous Protein, TRAP), proteína necessária para a motilidade dos esporozoítos e essencial para a invasão das glândulas salivares do mosquito vetor e dos hepatócitos do hospedeiro vertebrado (177-179). 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) carregando múltiplos epítomos de TRAP (180, 181). 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 (182, 183).

Além desses antígenos, também temos a Proteína de Travessia celular de Oocinetos e Esporozoítos (Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites, CelTOS). Essa proteína possui um papel fundamental na travessia de oocinetos no epitélio do estômago de mosquitos, como também na travessia dos hepatócitos no hospedeiro humano, atuando principalmente no momento da saída das células, sendo caracterizada tanto como um antígeno candidato a uma vacina pré-eritrocítica como uma vacina bloqueadora de transmissão (184-186). A CelTOS de *P. falciparum* (PfCelTOS) se encontra atualmente em ensaios clínicos de fase 1, como proteína candidata vacinal pré-eritrocítica, compondo uma formulação vacinal

baseada nesta proteína recombinante expressa em *E. coli* em associação ao adjuvante FMP012 (154, 187).

Na pesquisa de vacinas de estágio eritrocítico, destacam-se antígenos como o antígeno 1 de membrana apical (Apical Membrane Antigen-1, AMA-1). Esta proteína atua por meio de um complexo de receptores, formado por RON2, RON4 e RON5 (Rhoptry Neck, RON), secretados e inseridos nas membranas celulares promovendo a invasão de hepatócitos e eritrócitos (188, 189). Apesar do seu importante papel na invasão dessas células, essa proteína tem sido amplamente explorada principalmente como uma candidata vacinal de estágio sanguíneo (190, 191). Ela participa 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, isoladamente (ChAd63-AMA-1/MVA-AMA-1) ou em combinação com a CSP e a TRAP (ChAd63/MVA CSP TRAP AMA) (192, 193). Outro antígeno amplamente estudado é a proteína homóloga de ligação a reticulócitos 5 (Reticulocyte-binding protein homolog 5, RH5) de *P. falciparum*. Ela faz parte da família de proteínas de ligação a reticulócitos (Reticulocyte Binding-Like, 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 (194-196).

A família das proteínas de superfície de merozoítos (Merozoite Surface Protein, MSP) composta por 12 proteínas (MSP-1 a MSP-12) é caracterizada pelo seu envolvimento no reconhecimento e invasão dos eritrócitos (197, 198). Dentre as proteínas desta família amplamente estudadas, MSP-1 e MSP-3 se destacam por intensa investigação na literatura científica e por participarem de ensaios pré-clínicos e clínicos, respectivamente. Sendo a MSP-1 estudada como formulação vacinal na sua forma recombinante e MSP-3 sob a forma de vacina peptídica, baseada em epítopos presentes do aminoácido 181 ao 276 (168, 192). A proteína rica em glutamato (Glutamate-Rich Protein, GLURP) também é amplamente investigada e existem inúmeras evidências que a apontam como alvo. Essa proteína está localizada no complexo proteico Pfs38 na superfície de merozoítos de *P. falciparum* e se liga aos eritrócitos do hospedeiro humano diretamente por meio do receptor glicoforina A (199, 200). 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 MSP-3, atualmente em ensaios clínicos de fase 2 (198, 199).

O egresso dos merozoítos do interior dos eritrócitos é uma etapa essencial para garantir a manutenção do ciclo biológico do *Plasmodium*. Esse mecanismo de egresso 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 (Serine Repeat Antigen 5), 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 (201-203). O domínio N-terminal desta proteína expresso em *E. coli* se encontra em ensaios clínicos de fase 1 sendo denominado como a candidata SE36 (192). Dentre alguns dos antígenos mais recentes, a proteína 1 exportada de trofozoíto (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 (204-206).

No caso dos antígenos candidatos vacinais que são investigados a fim de compor vacinas bloqueadoras de transmissão, destacam-se proteínas como a P25 (Ookinete Surface Protein), proteína expressa na superfície de gametas antes da fertilização e posteriormente em níveis abundantes durante o desenvolvimento de zigotos e oocinetos (207-210). 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 (211). Além dos ensaios clínicos descritos, outros estudos investigam o uso da P25 por meio da estratégia de construção de partículas semelhantes a vírus, na qual essa proteína está inserida na proteína de revestimento do vírus do mosaico da alfafa (212).

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 formação do zigoto (210, 213, 214). Esta proteína é atualmente investigada em ensaios pré-clínicos que utilizam o seu fragmento C-

terminal na composição da formulação vacinal (192, 215). 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* (216, 217). 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 (218-220). Atualmente o domínio 1 da P230 de *P. falciparum* (P230D1M) se encontra em ensaios clínicos sob a forma conjugada a EPA (221).

1.11 Desenvolvimento de vacinas contra o *Plasmodium vivax*

Ao se analisar os intensos esforços destinados à investigação de vacinas voltadas para o *P. falciparum* ao longo dos anos, é evidente que o desenvolvimento de uma vacina específica para o *P. vivax* também consiste em uma tarefa árdua e que depende diretamente de um elevado suporte financeiro. Considerando que a pesquisa de vacinas para o *P. falciparum* teve uma enorme progressão nos últimos anos, avançando recentemente para os testes em larga escala com painéis de antígenos e com um candidato alcançando ensaios de Fase III (RTS,S/AS01), a maioria do desenvolvimento de vacinas para o *P. vivax* ainda está no início do desenvolvimento pré-clínico (36, 222, 223).

Atualmente existe uma única formulação vacinal em ensaios clínicos para *P. vivax*, a vacina Chad63/MVA PvDBP (154). Esta formulação é composta pelos vetores Chad63/MVA que codificam a sequência PvDPB_RII da linhagem de referência de *P. vivax* Salvador I (Sal-1) e foi testada em ensaios clínicos de fase 1 (224, 225). 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 do antígeno Duffy presente nos reticulócitos, permitindo assim a sua invasão (226). A região II desta proteína (PvDPB_RII) foi selecionada para compor esta vacina por corresponder a uma região conservada, extracelular, rica em cisteína e que abriga o seu domínio de ligação, e demonstrou em diversos estudos a

capacidade de induzir anticorpos inibitórios em roedores, coelhos e primatas não humanos (NHP) (224, 225, 227). Além dessa, 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 (154, 228). A outra formulação vacinal é a PvSPZ, atualmente investigada em ensaios pré-clínicos e é baseada na estratégia de esporozoítos atenuados por radiação (RAS) (229-231).

Essa enorme diferença na busca por vacinas contra o *P. falciparum* e o *P. vivax*, pode ser vista como resultado da reconhecida importância clínica atribuída ao *P. falciparum*, em função da alta letalidade e número de casos graves associados a esta espécie, que direcionou esforços e investimentos em estudos ao longo do tempo. Além disso, a existência de um cultivo *in vitro* contínuo bem estabelecido de *P. falciparum*, facilita e acelera o desenvolvimento de pesquisas. No entanto, os registros de casos de malária grave por *P. vivax* (232, 233), a emergência de cepas resistentes à cloroquina (50, 234) e à primaquina (235), além de sua ampla dispersão e enorme impacto socioeconômico em áreas endêmicas, tornam o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o *P. vivax* essencial para as estratégias de controle e eliminação da malária no mundo.

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, abriram portas e serviram como base para o direcionamento de novas pesquisas com propostas vacinais capazes de combinar diferentes antígenos de *P. vivax* e compor vacinas multiestágio altamente eficazes e específicas para esta espécie plasmodial (122). Estudos com *P. falciparum* já demonstraram bons resultados a partir da construção de antígenos recombinantes quiméricos baseados em candidatos vacinais já conhecidos, contendo múltiplos epítomos de diferentes regiões do parasito, como a MSP-FU24 baseados nas proteínas PfMSP-119 e PfMSP-3 (236), e a PfCP-2.9 (*P. falciparum* chimeric protein 2.9) baseada nas proteínas PfMSP-1 e PfAMA-1 já em ensaios clínicos (237).

Nesse sentido, acredita-se que um projeto de vacina ideal teria como alvo todos os estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*, que inclui estágios pré-

eritrocíticos, eritrocíticos e bloqueadores de transmissão. É amplamente aceito que uma vacina que forneça imunogenicidade contra vários estágios de desenvolvimento do parasito conferiria melhor proteção (238). Dessa forma, uma vacina para o *P. vivax* constituída com diferentes epítomos talvez seja importante para a inibição completa da invasão e o desenvolvimento do parasito em diferentes fases do ciclo, evento ainda pouco observado quando utilizados anticorpos para apenas uma região destas proteínas. Portanto, a nossa expectativa é que a identificação de epítomos imunodominantes e conservados, seguida da construção quimérica recombinante e os respectivos testes com este novo antígeno potencialmente vacinal representando as proteínas PvCelTOS, PvCyRPA e Pvs25 combinadas sejam uma adição significativa à lista limitada de antígenos candidatos vacinais contra o *P. vivax*.

1.12 CelTOS (Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites)

A proteína denominada CelTOS, que medeia a invasão do *Plasmodium* à célula hospedeira, vem sendo considerada uma alternativa na busca de antígenos candidatos vacinais. Esta proteína é secretada por micronemas, nos estágios invasivos dos hospedeiros, sendo importante no êxito da travessia celular realizada por esporozoítos e oocinetos (239). É conservada entre alguns parasitos do Filo Apicomplexa e, curiosamente, possui semelhança estrutural com a glicoproteína gp41 de HIV-1 e com uma toxina formadora de poro da *Mycobacterium tuberculosis* (185).

Estudos já demonstraram que a interrupção de genes codificantes da CelTOS, em *P. berghei*, reduz a infectividade no mosquito hospedeiro e também a infectividade do esporozoíto no fígado, quase eliminando a sua capacidade de travessia celular (239). Um estudo realizado por Jimah e colaboradores demonstrou, através de cristalografia, que essa proteína se liga especificamente ao ácido fosfatídico, um lipídeo predominantemente encontrado no folheto interno das membranas plasmáticas. Também foi demonstrado que a CelTOS tem a potencialidade de romper os lipossomas compostos de ácido fosfatídico através da formação de poros, o que permite a saída dos parasitos da célula hospedeira durante o percurso de travessia (**Figura 6**) (185).

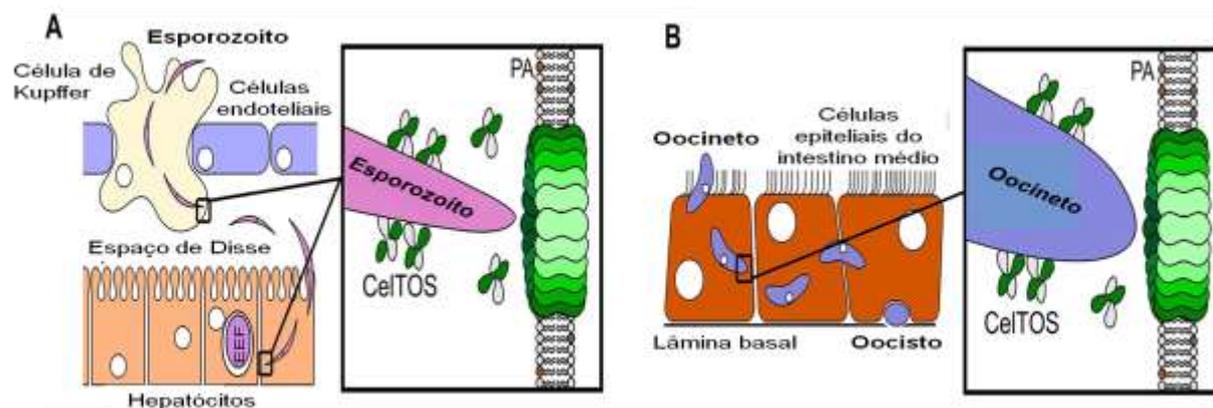


Figura 6 - Modelo para a CelTOS na passagem celular.

Adaptado e traduzido de Jimah *et al* 2016 (185). (A) Durante a fase pré-eritrocítica, os esporozoítos atravessam várias células de Kupffer e hepatócitos antes de invadir o hepatócito que será o seu local de desenvolvimento. A CelTOS forma poros e rompe as membranas celulares destas células para permitir a saída dos esporozoítos, de forma a concluir sua travessia. Essa ruptura ocorre através da ligação direta ao ácido fosfatídico (PA), no folheto interno, para criar um poro que permite a saída do esporozoíto. EEF - forma exoeritrocitária. (B) No mosquito vetor, os oocinetos atravessam o epitélio do intestino médio do mosquito para atingir a lâmina basal, onde se desenvolvem em oocistos. A CelTOS realiza o mesmo procedimento de ruptura e formação de poro, assim como visto na etapa A.

A CelTOS foi identificada por análise genômica e funcional de proteínas expressas em estágios móveis do ciclo de vida do parasito. É uma proteína conservada entre diferentes espécies do *Plasmodium* e também entre outras espécies do filo Apicomplexa, indicando que o gene *celtos* evoluiu de um ancestral comum (**Figura 7**) (239, 240). Nesse sentido, foi demonstrado pela primeira vez por Bergmann-Leitner e colaboradores, em 2010, que a imunização com recombinantes de CelTOS de *P. falciparum* (PfCelTOS), em modelo murino, induz proteção cruzada contra a malária, causada pela espécie heteróloga *P. berghei*. Vale ressaltar que essa imunização com a sequência conservada da proteína CelTOS induziu uma significativa reatividade cruzada, tanto ao nível humoral, quanto celular (241). Além disso, relatou-se pela primeira vez o potencial da CelTOS como um antígeno protetor. Verificou-se que uma resposta humoral anti-CelTOS seria capaz de inibir *in vitro* a invasão de esporozoítos em hepatócitos, bem como a motilidade do parasito, conferindo, dessa maneira, proteção (241, 242). Entretanto, tal reatividade cruzada não foi reportada em *P. vivax*. Acreditamos que uma das razões para essa ausência de reatividade pode ser o menor grau de similaridade entre a CelTOS de *P.*

falciparum e *P. vivax* (63%) e, dessa forma, a presença de diferentes aminoácidos nos epítomos identificados em *P. falciparum* pode ter reflexo na reatividade cruzada com *P. vivax*.

<i>P. berghei</i>	1	MNKLTKLSVISSVF-VFFCFFNVLCCLRGKNGSEMSSFLEGGVSS
<i>P. vivax</i>	1	MNKVNRVSIICA-FLALFCFVNVLSLRGKSGSTASSSLEGGSEFS
<i>P. falciparum</i>	1	MNALRRLPVICS-FLVFLVFSNVLCFRGNNGHNSSSSLYNGSOFI
<i>P. berghei</i>	45	NRIKKSLAS-FISESSSLDDIGNGLAETITNEIFSAFQODSSSFL
<i>P. vivax</i>	45	ERIGNSLSS-FLSESASLEVIGNELADNIANEIVSSLQKDSASFL
<i>P. falciparum</i>	45	EQLNNSFTSAFLESQ-SMNKIGDDLAETISNELVSVLQKNSPTFL
<i>P. berghei</i>	89	QTKFDIKKHIKENAKKVLIEAIRLGLPEVEKIVAQSTOPPKVNRH
<i>P. vivax</i>	89	QSGFDVKTQKATAKKVLVEALKAALPTTEKIVASTIKPPRVSED
<i>P. falciparum</i>	89	ESSFDIKSEVKKHAKSMLKELIKVGLPSFENLVAENVKPPKVDPA
<i>P. berghei</i>	134	TYSLVSPVVKALFNKIEEAVHKPVSDNIWDYAGGDDEYE-ETEED
<i>P. vivax</i>	134	AYFLLGPVVKTLFNKVEDVLHKPIPDTIWEYESKGS-LEEEEAED
<i>P. falciparum</i>	134	TYGIIVPVLTSLFNKVETAVGAKVSEIWNYNSPDVSESEESLSD
<i>P. berghei</i>	178	NFDNDFFN
<i>P. vivax</i>	178	EFSDLLD
<i>P. falciparum</i>	179	DEFD----

Figura 7 - Comparação das sequências de aminoácidos da CelTOS de *P. berghei* (PbCelTOS) com as ortólogas de *P. falciparum* e *P. vivax*.

A sequência de aminoácidos de PbCelTOS foi alinhada com a PfCelTOS (PlasmoDB identificador PFL0800c) e PvCelTOS. Os resíduos conservados estão grifados em cinza. Os números de aminoácidos a partir do primeiro resíduo Met (metionina) estão mostrados à esquerda de cada linha; e a sequência de sinal N-terminal predita está sublinhada (239).

Corroborando com os resultados já existentes, também já foi demonstrado que peptídeos específicos da PfCelTOS podem estimular as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), isoladas a partir de voluntários imunizados com esporozoítos irradiados, para produzir respostas antígeno-específicas com altos níveis de IFN- γ , enfatizando o potencial impacto imunológico deste antígeno (243). Em 2014, Kusi e colaboradores demonstraram que a recombinante da PfCelTOS foi reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos de populações expostas que vivem em áreas de alta endemicidade da África (244). Por fim, um estudo de predição da reatividade das células T CD4⁺ e CD8⁺ revelou vários epítomos distribuídos ao longo de toda a sequência da PfCelTOS, mas as análises funcionais *in vivo* feitas pela técnica ELISPOT indicaram que epítomos C-terminais eram mais imunogênicos (240). No entanto, embora existam diversas evidências sobre o potencial antigênico da proteína CelTOS de *P. falciparum*, pouco era conhecido sobre o potencial da proteína homóloga em *P. vivax* (PvCelTOS), visto que não há

reatividade cruzada entre ambas. Portanto, o nosso grupo demonstrou que a PvCelTOS é altamente conservada em isolados de *P. vivax* de cinco regiões diferentes da Amazônia Brasileira (245), e que a PvCelTOS recombinante é alvo de resposta imune naturalmente adquirida mediada por anticorpos IgG em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária (246), demonstrando assim o seu potencial como proteína candidata vacinal. Ambos artigos e dados foram publicados no final do mestrado.

1.13 CyRPA (Cysteine-Rich Protective Antigen)

A CyRPA é uma proteína de aproximadamente 43 kDa e, de acordo com a técnica de cristalografia, apresenta uma hélice β de seis lâminas com cinco ligações dissulfeto (247). Essa proteína vem sendo apontada como uma nova alternativa nos estudos de antígenos candidatos vacinais contra a malária, sendo considerada essencial no processo de invasão dos merozoítos aos eritrócitos durante o estágio sanguíneo da doença (248).

A CyRPA está localizada no micronema, estrutura presente no complexo apical do merozoíto, e já foi observado em *P. falciparum* que ela se liga a outras duas proteínas apicais formando o complexo heterotrimérico PfRh5/PfRipr/CyRPA, de alta afinidade, que desempenha papel-chave na fase de pré-invasão (247, 249). Esse complexo está associado à formação de um poro entre o merozoíto e o eritrócito, permitindo o influxo de Ca^{+2} na célula hospedeira e criando um cenário favorável para a entrada do parasito (247). Apesar do papel fundamental deste complexo na invasão dos eritrócitos, não foi identificado nenhum ortólogo da PfRh5 em espécies de *Plasmodium* além das espécies intimamente relacionadas ao *P. falciparum*, subgênero Laverania. Não havendo, por exemplo, o seu ortólogo em *P. vivax*. Nesse contexto, em virtude da ausência de um ortólogo de PfRh5 fora do subgênero Laverania, outras proteínas são responsáveis e essenciais no processo de invasão dos eritrócitos em outras espécies (**Figura 8**). Um estudo realizado por Knuepfer, em 2019, com o *P. knowlesi*, espécie causadora de malária em primatas e, taxonomicamente relacionada ao *P. vivax*, demonstrou a presença dos ortólogos da PfCyRPA e PfRipr encontrados no seu genoma e essenciais para invasão dos eritrócitos e sua sobrevivência *in vitro* (250). No entanto a PkCyRPA apresentou ter função independente, já que nenhuma proteína de interação foi identificada. Estudos

revelam que ela está envolvida no processo de invasão e é essencial para a sobrevivência do parasito (248, 251).

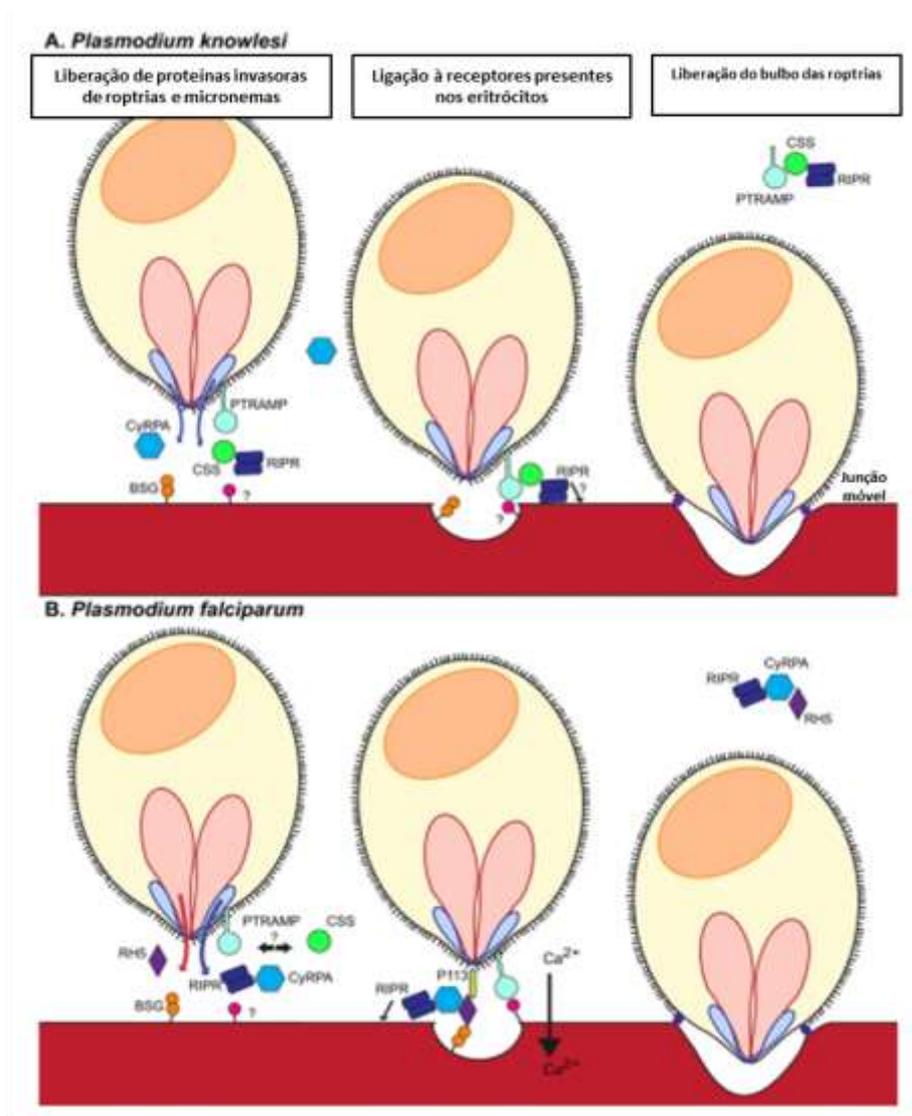


Figura 8 - Comparação entre as estruturas envolvidas no processo de invasão ao eritrócito por (A) *P. knowlesi* e (B) *P. falciparum*.

Adaptado e traduzido de Knuepfer *et al*, 2019 (250).

O estágio de pré-invasão dos eritrócitos é um evento significativo para o desenvolvimento de vacinas, tendo em vista que é um momento em que há uma exposição direta do parasito e de suas estruturas superficiais e apicais ao sistema imunológico, dessa forma facilita o reconhecimento de antígenos e a ação de uma resposta humoral potencialmente eficaz (252).

Diferentes trabalhos com a proteína CyRPA de *P. falciparum* já demonstraram o seu papel inibitório na invasão de merozoítos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estudos já demonstraram que anticorpos monoclonais produzidos em camundongos BALB/c

contra a PfCyRPA recombinante inibem o crescimento do parasito (253). Além disso, uma pesquisa realizada com isolados da Índia e da África demonstrou que os anticorpos contra a PfCyRPA exibiram potente neutralização do merozoíto, podendo estar associado à redução de risco de malária nas infecções naturais (254). Também já foi descrito por Volz e colaboradores, em 2016, que a perda de função da PfCyRPA através da deleção do gene codificante, resulta na diminuição da capacidade dos merozoítos invadirem a célula hospedeira (255). Ademais, estudos *in vivo*, feito por Dreyer e colaboradores, em 2012, observaram que anticorpos monoclonais específicos para PfCyRPA demonstraram inibição do crescimento de *P. falciparum* em camundongos nulos NOD-scid IL2Ry enxertados com eritrócitos humanos (256). No entanto, não se sabe ainda sobre o mecanismo envolvido neste processo.

Ainda corroborando com os resultados já descritos, um estudo recente demonstrou que as PfCyRPA, PfRh5 e PfRipr foram menos imunogênicas quando apresentadas no complexo trimérico. Em relação aos títulos de anticorpos, a proteína PfCyRPA apresentou uma diferença marcante quando usada como alvo único de imunização. Um ensaio de ELISA comparativo demonstrou que títulos de anticorpos para PfCyRPA são de aproximadamente 7,5 vezes mais baixo quando apresentados em complexo trimérico do que quando usada como alvo único, confirmando as previsões do estudo de que os epítomos na CyRPA são mascarados pelas faces de ligação de Ripr e Rh5 (257). Dessa forma, esses dados reforçam a importância do estudo singular da proteína CyRPA como um potencial candidato vacinal.

No entanto, todos esses trabalhos anteriores utilizaram a proteína CyRPA de *P. falciparum*. Em relação ao *P. vivax*, um estudo realizado por França e colaboradores, em 2017, demonstrou que os anticorpos contra a proteína PvCyRPA estão fortemente relacionados com proteção. Um fato curioso é que o efeito protetor desses anticorpos dirigidos contra a PvCyRPA foi superior ao efeito dos anticorpos dirigidos contra outras proteínas classicamente descritas como candidatas vacinais, como por exemplo MSP-1, MSP-3, MSP-9 e AMA-1 (258). Em paralelo, existe apenas um trabalho acerca da diversidade genética e estrutura populacional da PvCyRPA, realizado recentemente por Gonzalez e colaboradores, em 2021, utilizando isolados do México (259). Enquanto isso, ainda não existia nenhum relato utilizando isolados brasileiros e de áreas endêmicas e, principalmente, abordando o impacto destes polimorfismos no desenvolvimento de vacinas baseadas nesta

proteína. Nesse contexto, o nosso grupo demonstrou recentemente que o gene *pvcyrpa* apresenta uma variabilidade genética moderada nos isolados estudados e tais polimorfismos alteram sequências de aminoácidos contidas em potenciais epítomos de células B, uma observação importante considerando a potencialidade do antígeno como candidato a vacina para cobrir distintas áreas endêmicas de *P. vivax* em todo o mundo (260).

1.14 P25 (Ookinete Surface Protein)

A proteína de superfície de oocineto denominada P25 possui peso molecular de 25 kDa e já foi descrita em diferentes espécies de *Plasmodium* (261). Essa proteína possui uma importante função no ciclo biológico, interferindo no desenvolvimento de oocistos no intestino médio do mosquito (262), podendo assim interromper a transmissão da malária. É especificamente expressa na superfície dos gametas, zigotos e oocinetos de *Plasmodium* em desenvolvimento (263). Inicia a sua expressão ainda nos gametócitos, antes mesmo da fertilização dos gametas. Atingindo o pico de síntese nas horas iniciais, sendo posteriormente expressa em maior abundância na superfície de zigotos e oocinetos em desenvolvimento, considerada assim um alvo de pós-ativação (**Figura 9**) (264, 265). Essa proteína contém estruturas conservadas, caracterizadas por uma sequência sinal, quatro domínios semelhantes ao Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) dispostos no formato de um triângulo, seguido por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) na extremidade C terminal (266). É rica em cisteína e restrita por até 11 ligações dissulfeto (267). Os domínios EGF são conhecidos por estarem presentes especialmente em proteínas de superfície, onde participam em processos de reconhecimento e de adesão (268), o que indica que eles desempenham papéis importantes nas interações parasito-hospedeiro.

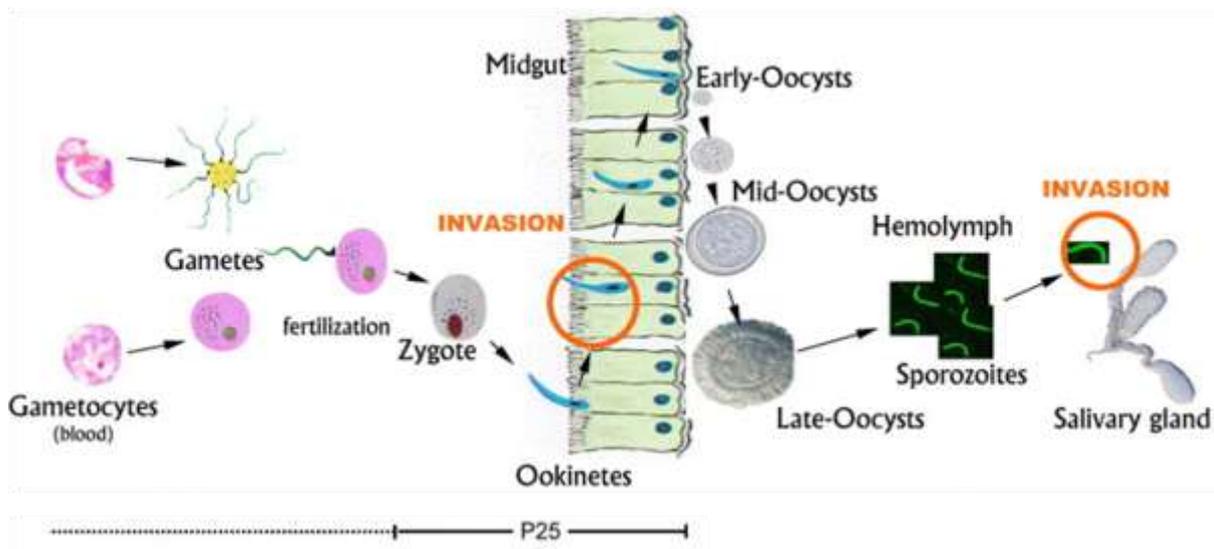


Figura 9 - Ciclo de vida do *Plasmodium* no inseto vetor e expressão gênica da P25.

Adaptado de Moreira et al, 2004 (265).

Embora a função da proteína P25 ainda não seja totalmente reconhecida, em *P. berghei*, já foi demonstrado que essa proteína tem propriedades múltiplas e parcialmente redundantes durante o desenvolvimento de oocinetos e oocistos. A proteína é essencial para a sobrevivência de oocinetos no intestino médio do mosquito, subsequente penetração do epitélio do intestino médio e posterior transformação de oocineto em oocisto (269).

Diversas plataformas que utilizam antígenos de estágio sexual como candidatos vacinais demonstraram anticorpos com atividade de bloqueio de transmissão (270). Anticorpos induzidos contra a proteína Pfs25 bloquearam significativamente a transmissão da malária em primatas não humanos (271). Experimentos já demonstraram que os anticorpos bloqueadores de transmissão diminuem o movimento do oocineto dentro do intestino do mosquito (272), e em virtude do atraso na formação do oocisto, o oocineto não é capaz de sobreviver dentro desse severo ambiente proteolítico (273). Estudos já mostraram que níveis de anticorpos contra a proteína estão diretamente relacionados à atividade de bloqueio da transmissão (274), visto também em versões recombinantes da proteína (275, 276).

A Pvs25 tem sido considerada uma vacina promissora contra o *P. vivax*, uma vez que anticorpos específicos induzidos em camundongos ou macacos *Aotus* imunizados bloqueiam completamente a capacidade do *P. vivax* para infectar os

mosquitos *Anopheles* (277, 278). Em humanos, a Pvs25 recombinante foi reconhecida por anticorpos de populações expostas em Mianmar (279). Atualmente, apenas a Pfs25 e a Pvs25 foram testadas em ensaios clínicos de Fase Ia, demonstrando o potencial deste antígeno como um componente de uma vacina de bloqueio de transmissão (280, 281).

Diferentemente do extenso polimorfismo genético comumente observado em vários antígenos de *Plasmodium*, o gene *pvs25* é considerado bastante conservado, apresentando pouca variabilidade em sua sequência, provavelmente porque posteriormente essa proteína não é exposta ao sistema imunológico de vertebrados (282). Análises de sequências gênicas revelaram uma organização estrutural bem semelhante e sua diversidade genética já foi pesquisada entre diferentes isolados de países asiáticos (263). Assim como diferentes estudos também já demonstraram e confirmaram o potencial deste antígeno como candidato vacinal (280, 283). Entretanto, ainda não havia estudos sobre a diversidade genética incluindo isolados de diferentes áreas brasileiras, bem como sobre o mapeamento de epítomos, e essas informações adicionais de suma importância foram publicadas recentemente pelo nosso grupo (209), enriquecendo o campo de pesquisa dessa proteína candidata vacinal.

2 JUSTIFICATIVA

A geração de quimeras recombinantes que possuam genes oriundos de mais de uma proteína candidata vacinal e que possua sequência gênica codificante apenas para as regiões imunogênicas de tais proteínas, é uma alternativa atrativa e viável. A construção de antígenos recombinantes quiméricos baseados em candidatos vacinais já conhecidos e contendo múltiplos epítomos de diferentes regiões do parasito vem obtendo bons resultados em construções baseadas em antígenos de *P. falciparum*, com antígenos quiméricos como a MSP-FU24 baseados nas proteínas PfMSP-119 e PfMSP-3 (236), e utilizando a PfCP-2.9 (*P. falciparum* chimeric protein 2.9) baseada nas proteínas PfMSP-1 e PfAMA-1 já em ensaios clínicos (237). Em relação ao *P. vivax*, o restrito número de regiões descritas como imunogênicas e a ausência de um cultivo *in vitro* tornam-se fatores limitantes para a identificação, purificação de antígenos, construção e expressão de proteínas recombinantes quiméricas. Dessa forma, uma vacina para o *P. vivax* constituída com diferentes epítomos talvez seja importante para a inibição completa da invasão e o desenvolvimento do parasito em diferentes fases do ciclo, evento ainda pouco observado quando utilizados anticorpos para apenas uma região destas proteínas. Portanto, a análise da variabilidade genética e a avaliação do impacto nos epítomos de células B, gerem informações de grande importância para a construção de um antígeno quimérico potencialmente vacinal contra os três estágios de desenvolvimento do parasito no hospedeiro vertebrado (esporozoítos, merozoítos e oocinetos).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os aspectos moleculares de cada proteína de estudo (PvCyRPA e Pvs25) em relação ao seu potencial como candidata vacinal contra o *P. vivax*, para desenvolver uma quimera recombinante contendo múltiplos epítomos de diferentes estágios de desenvolvimento do *P. vivax*.

3.2 Objetivos específicos

- Desenhar e validar os iniciadores específicos (*primers*) do gene *pvcyrpa*;
- Identificar os genes *pvcyrpa* e *pvs25* em isolados provenientes de áreas endêmicas brasileiras a partir da técnica de amplificação por PCR e visualização em gel de agarose;
- Avaliar a variabilidade genética dos genes *pvcyrpa* e *pvs25* nos isolados brasileiros através da reação de sequenciamento;
- Realizar a predição *in silico* dos possíveis epítomos de células B presentes nas proteínas PvCyRPA e Pvs25;
- Avaliar o impacto dos polimorfismos nas regiões potencialmente antigênicas.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 1 (PvCyRPA) - Genetic Diversity of *Plasmodium vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen (PvCyRPA) in field isolates from five different areas of the Brazilian Amazon (260).

A proteína PvCyRPA (*P. vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen) tem um papel importante na invasão de eritrócitos e tem sido considerada um alvo para o desenvolvimento da vacina contra a malária vivax. No entanto, sua diversidade genética permanecia desconhecida em áreas brasileiras endêmicas de malária. Portanto, nesse artigo investigamos o polimorfismo genético da *pvcyrpa* em 98 isolados de campo da Amazônia Brasileira e avaliamos o seu impacto na antigenicidade dos epítomos de células B preditos *in silico*. Parâmetros de diversidade genética, análise genética populacional, teste de neutralidade e rede de junção de medianas foram analisados. Investigamos também a participação potencial de polimorfismos nos epítomos de células B. Um total de 1 substituição sinônima e 26 substituições não sinônimas resultaram em 50 haplótipos. A diversidade de nucleotídeos e os valores D de Tajima variaram ao longo do gene codificante. Além disso, a sequência gênica do éxon-1 apresentou uma maior diversidade quando comparada à sequência do éxon-2. Com relação à análise de predição, 7 sequências foram preditas como epítomos lineares de células B, estando a maioria destes contida em epítomos conformacionais. Ademais, importante polimorfismo de aminoácidos foi detectado em regiões preditas como epítomos de células B. Em suma, nossos dados sugerem que o gene *pvcyrpa* apresenta um polimorfismo moderado nos isolados estudados e tais polimorfismos alteram as sequências de aminoácidos contidas em potenciais epítomos de células B, uma observação importante considerando a potencialidade do antígeno como candidato a vacina para cobrir distintas áreas endêmicas de *P. vivax* em todo o mundo.

Article

Genetic Diversity of *Plasmodium vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen (PvCyRPA) in Field Isolates from Five Different Areas of the Brazilian Amazon

Lana Bitencourt Chaves ¹, Glaucia de Oliveira Guimarães ¹, Daiana de Souza Perce-da-Silva ², Dalma Maria Banic ³, Paulo Renato Rivas Totino ⁴, Ricardo Luiz Dantas Machado ⁵, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva ⁶, Lilian Rose Pratt-Riccio ⁴, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro ⁴ and Josué da Costa Lima-Junior ^{1*}

- ¹ Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; lana.bitencourt@hotmail.com (L.B.C.); goguimaraes.go@gmail.com (G.d.O.G.)
- ² Laboratory of Basic and Applied Immunology, Arthur Sa Earp Neto University Center, Petrópolis 25680-120, Brazil; daiana_perce@hotmail.com
- ³ Laboratory of Clinical Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; dmbanic@gmail.com
- ⁴ Laboratory of Malaria Research, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; ptotino@ioc.fiocruz.br (P.R.T.); riccio@ioc.fiocruz.br (L.R.P.-R.); malaria@ioc.fiocruz.br (C.T.D.-R.)
- ⁵ Department of Microbiology and Parasitology, Biomedical Institute, Fluminense Federal University, Rio de Janeiro 24210-130, Brazil; nicardomachado@id.uff.br
- ⁶ Laboratory of Monoclonal Antibodies Technology, Institute of Immunobiology Technology, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; rnsufrj@gmail.com
- * Correspondence: josue@ioc.fiocruz.br; Tel.: +55-21-38658150

Citation: Bitencourt Chaves, L.; Guimarães, G.d.O.; Perce-da-Silva, D.d.S.; Banic, D.M.; Totino, P.R.R.; Machado, R.L.D.; Rodrigues-da-Silva, R.N.; Pratt-Riccio, L.R.; Daniel-Ribeiro, C.T.; Lima-Junior, J.d.C. Genetic Diversity of *Plasmodium vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen (PvCyRPA) in Field Isolates from Five Different Areas of the Brazilian Amazon. *Genes* **2021**, *12*, 1657. <https://doi.org/10.3390/genes12111657>

Academic Editor: José Antonio Garrido-Cárdenas

Received: 27 August 2021
Accepted: 27 September 2021
Published: 21 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The *Plasmodium vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen (PvCyRPA) has an important role in erythrocyte invasion and has been considered a target for *vivax* malaria vaccine development. Nonetheless, its genetic diversity remains uncharted in Brazilian malaria-endemic areas. Therefore, we investigated the *pvcyrrpa* genetic polymorphism in 98 field isolates from the Brazilian Amazon and its impact on the antigenicity of predicted B-cell epitopes. Genetic diversity parameters, population genetic analysis, neutrality test and the median-joining network were analyzed, and the potential amino acid polymorphism participation in B-cell epitopes was investigated. One synonymous and 26 non-synonymous substitutions defined fifty haplotypes. The nucleotide diversity and Tajima's D values varied across the coding gene. The exon-1 sequence had greater diversity than those of exon-2. Concerning the prediction analysis, seven sequences were predicted as linear B cell epitopes, the majority contained in conformational epitopes. Moreover, important amino acid polymorphism was detected in regions predicted to contain residues participating in B-cell epitopes. Our data suggest that the *pvcyrrpa* gene presents a moderate polymorphism in the studied isolates and such polymorphisms alter amino acid sequences contained in potential B cell epitopes, an important observation considering the antigen potentiality as a vaccine candidate to cover distinct *P. vivax* endemic areas worldwide.

Keywords: Malaria; Brazilian Amazon; *Plasmodium vivax*; PvCyRPA; genetic diversity; prediction; vaccine candidate

1. Introduction

Malaria remains an important public health problem in several countries of tropical and subtropical regions of the world. In 2019, the disease caused an estimated 229 million clinical cases and around 409,000 deaths worldwide [1]. Among the *Plasmodium* species causing malaria in humans, *Plasmodium vivax* is the most widely distributed and prevalent

outside of Africa [2]. In Brazil, endemic regions are restricted to the Legal Amazon, a region that currently accounts for the majority (>99%) of the countrywide malaria burden [3] and where *P. vivax* is predominant, with approximately 90% of the reported cases [4]. Several exclusive features of *P. vivax* biology, including the dormant liver stage, make it more resistant than other *Plasmodium* species to malaria elimination [5]. Thus, *P. vivax* presents a difficult obstacle to malaria elimination in endemic countries [6]. Therefore, it is very important to develop new methods and intervention strategies to block or reduce this transmission.

The complex life cycle of the *Plasmodium* includes an erythrocytic phase that is responsible for the clinical symptoms of malaria [7]. In this phase, *P. vivax* preferentially invades reticulocytes [8] in a process that occurs by sequential multiple molecule interactions, with each step mediated by antigens belonging to different protein families present on the merozoite surface and its apical organelles (i.e., micronemes and rhoptries) [9], which interact with a series of specific receptors on the erythrocyte surface to complete the invasion process [10]. The Cysteine-Rich Protective Antigen (CyRPA) is localized in the micronemes and is involved in the invasion process of merozoites into erythrocytes [11]. In *Plasmodium falciparum*, studies with the PfCyRPA protein have already demonstrated its inhibitory role in the invasion of merozoites both in vitro and in vivo, suggesting its potential as a candidate for asexual blood phase vaccine [12–14]. However, data demonstrating the potential of *P. vivax* CyRPA (PvCyRPA) as a vaccine candidate are still scarce and conflicting. França and collaborators demonstrated that antibodies against PvCyRPA are strongly related to protection. Interestingly, the protective effect of antibodies directed against PvCyRPA was higher than other proteins classically described as vaccine candidates, such as MSP-1, -3, -9 and AMA-1 [15]. On the other hand, in vitro studies of Ndegwa et al. (2021) showed that polyclonal antibodies raised against full-length PvCyRPA did not affect *P. knowlesi* growth [16].

A vaccine able to produce antibodies that effectively prevent the invasion process after the release of merozoites into the bloodstream may decrease parasite burden, disease symptoms and, indirectly, malaria transmission [17]. However, extensive allelic polymorphism in erythrocyte invasion pathways is known to limit the action of neutralizing antibodies against merozoite candidate vaccine antigens [18]. Malaria parasites have abundant genetic polymorphisms, much of which have evolved to escape host immune responses and thus present a major obstacle to the development of an effective malaria vaccine [19,20]. The genetic diversity and population structure of *P. vivax* for each candidate antigen is an important priority to the understanding of the malaria transmission dynamics [21]. In this scenario, many studies have been proposed to investigate the global diversity of leading vaccine antigens [22], and only one was recently addressed to the PvCyRPA [23], which does not include Brazilian malaria-endemic areas. Therefore, to understand the potential of PvCyRPA in vaccine development, we proposed to identify *pvcyrrpa* gene in clinical isolates from different regions of the Brazilian Amazon and to study the potential impacts of the genetic diversity in predicted epitopes through bioinformatics tools.

2. Materials and Methods

2.1. Study Areas and Blood Sample Collection

Most cases of malaria in Brazil are concentrated in the Amazon Region, an endemic area for the disease [24]. For that reason, the study was carried out in five different regions of the Brazilian Amazon, with a set of 98 *P. vivax*-infected individuals previously described by our group: 31 from Cruzeiro do Sul, 17 from Mâncio Lima, 4 from Guajará, 37 from Manaus and 9 individuals from Oiapoque [25].

All 98 *P. vivax* participants were enrolled according to the following criteria: sought medical assistance for clinical malaria symptoms, presented uncomplicated malaria symptoms, were >18 years of age, and had a positive *P. vivax* malaria diagnosis. Pregnant women and *P. falciparum*-infected individuals were excluded from the study. Thin and

thick blood smears were examined for the identification of the malaria parasite by a technician experienced in malaria diagnosis from the Brazilian Malaria Health Services. Thick blood smears from all subjects were stained with Giemsa, and a total of 200 microscopic fields were examined under a 1000-fold magnification. Thin blood smears of the positive samples were examined for species identification. To increase the sensitivity of parasite detection, molecular analyses using specific primers for genus (*Plasmodium* sp.) and species (*P. falciparum* and *P. vivax*) were performed in all the samples as previously described [26]. Donors positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated by the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

2.2. Ethical Considerations

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of each locality, which included obtaining the following patients' written consents for research use of their blood samples: Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima and Guajará were reviewed and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Research Ethics Committee, CEP-Fiocruz CAAE 46084015.1.0000.5248. In addition, the protocol of other blood sample collection was approved by the Research Ethics Committee of each locality: Manaus (CEP-Fiocruz): 346-613; Oiapoque (Hospital Municipal do Oiapoque/AP): 68980-000.

2.3. Genomic DNA Extraction

The DNA from 98 blood samples was previously extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and, then, stored at -20°C until amplification.

2.4. Design of *Pvcyrrpa* Specific Primers

The specific primers of *pvcyrrpa* gene (1101 bp) were designed using standard gene sequences of *P. vivax* Salvador-1 (Sal-1) strain from GenBank NCBI Reference Sequence: XM_001615090.1 (Gene ID: PVX_090240). All oligonucleotides were designed and checked for specificity by using the Primer-BLAST tool provided by the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, accessed on 13 august 2019) and the design quality of the oligonucleotides was evaluated by OligoAnalyzer v.3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyze/>, accessed on 13 august 2019) to avoid homodimers and heterodimers (Table 1). The specific primers were chemically synthesized to perform PCR and DNA sequencing. The *pvcyrrpa* gene has a structure consisting of two exons separated by a small well-conserved intron located on chromosome five, encoding for a microneme protein [22,27–29]. Consequently, from the extracted genomic DNA, the two exons of the *pvcyrrpa* gene were amplified separately using two different primer sets, resulting in two gene lengths.

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) primers used for the amplification of the *pvcyrrpa* gene.

	PCR Primers	Direction	Sequence (5'–3')	Gene Length (bp)
Exon-1	PvCyRPA_F1	Forward primer	TGCAATTTTCCTCTTCTTCTCC	600
	PvCyRPA_R1	Reverse primer	CCCCATGTTCTTCCCTTGCTT	
Exon-2	PvCyRPA_F2	Forward primer	CCTGATAAACTACGAAGAGCTCCA	466
	PvCyRPA_R2	Reverse primer	CCTCGTATAGTAAAGCGTGT	

Specific primers used for conventional PCR and sequencing of the *pvcyrrpa* gene.

2.5. PCR Amplification of *Pvcyrrpa* Gene

All the *pvcyrrpa* genes reported in this study were amplified by conventional PCR using the two pairs of primers designed and described above. PCR reactions of the *pvcyrrpa*

gene were carried out in 25 μ L volume that included 3 μ L of DNA, 10 pmol/ μ L of each primer and the Master Mix kit (Promega, Madison, WI, USA) containing Taq DNA polymerase, PCR buffer and 10 nmol of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP, Promega, Madison, WI, USA). The conventional PCR reaction was carried out using a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the amplification conditions were as follows: for the first exon, one step at 95 °C for 2 min, 30 cycles at 95 °C for 1 min, 56 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and the last step at 72 °C for 1 min. For the second exon, the temperatures and the number of cycles remained the same, except for the annealing temperature, which was 59 °C for 1 min. The PCR conditions for the amplification of PvCyRPA F1/R1 generated the first *pvcyrrpa* gene fragment (600 bp) and the PCR conditions for amplification of PvCyRPA F2/R2 yielded the second *pvcyrrpa* gene fragment (466 bp). In all reactions, two negative controls (one without DNA and the other with DNA extracted from in vitro culture of *P. falciparum* PSS1 strain) and positive control (*P. vivax*-infected sample) were used. To confirm the presence of DNA from the in vitro culture of *P. falciparum* and that the lack of amplification was due to the specificity of the primers for *pvcyrrpa*, we performed the amplification of the *P. falciparum* *p126* gene fragment and electrophoresis as previously described [30]. After PCR, ten μ L of amplified products were size-fractionated by electrophoresis within 2% agarose gel (Sigma Aldrich, Missouri, USA) in 1 \times TAE buffer (0.04 M TRIS-acetate, 1 mM EDTA) in the presence of 1 \times GelRed nucleic acid stain (Biotium, Fremont, CA, USA). PCR products were visualized by ultraviolet (UV) illumination. The sizing of products was performed using a GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Then, amplicons were purified using the GE Healthcare Lifesciences kit following the manufacturer's instructions. Afterward, 5–50 ng of DNA was used per sequencing reaction employing the Sanger method, using forward and reverse primers.

2.6. DNA Sequencing and Polymorphism Analysis

The specificity of the assay was confirmed by sequencing the PCR products from all positive samples using a Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The DNA sequencing was carried out on the ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the support of Focruz Genomic Platform and all the results were analyzed using DNASTAR's sequence alignment software [31]. Moreover, the sequences were also analyzed in BioEdit sequence alignment editor to better-visualized SNP positions, employing ClustalW multiple sequence alignment and the Sal-1 strain as a reference sequence.

To analyze hypothetical PvCyRPA protein derivatives from *P. vivax* genome data available and Mexico isolates already available, multiple sequence alignments were conducted with Clustal Omega using the MegAlign Pro 15 (Lasergene DNASTAR) program. The following sequences were used: India VII—GenBank: gb|KMZ81773.1; North Korean—GenBank: gb|KNA00954.1; Mauritania I—Genbank: gb|KMZ94334.1; Brazil I—GenBank: gb|KMZ87926.1; Sanger Institute: SCO 66052.1; Sanger Institute: SCO71483.1; Sanger Institute: SGX76259.1; Mexico-Southern Mexican [23]. Additionally, our Brazilian Amazon isolates were compared to P01 strain (PVP01_0532400), a new reference genome for *P. vivax* from an Indonesian clinical isolate [32], and the circular map of protein alignment was generated using the software GenVision v15 (Lasergene DNASTAR).

Multiple alignment Clustal Omega, distance matrix, and the phylogenetic tree were conducted using the MegAlign Pro 15 (Lasergene DNASTAR) program and the circular map of protein alignment was generated using the software GenVision v15 (Lasergene DNASTAR).

2.7. Genetic Analysis of the Coding Gene

Genetic diversity of *pvcyrrpa* sequences was analyzed using the DnaSP v6 software [33] to estimate within-population diversity based on the genetic diversity parameters as

the number of segregation sites (S), the number of haplotypes (h), haplotype diversity (H_d), and nucleotide diversity (π).

Natural selection in *pvcyrpa* was assessed by the Tajima's D and Z -test. To test the neutral theory of evolution, Tajima's D values [34] were calculated using the total number of mutations also estimated with DnaSP v.6 software. This test informs about the selection and demographic forces acting on a population. Positive values might be suggestive of positive or balancing selection. This force maintains alleles at balanced frequencies. On the other hand, negative values suggest purifying selection or recent population expansion [34]. The Z -test method was performed with MEGA7 v.6.0; the rates of non-synonymous (dN) to synonymous (dS) substitutions (dN/dS) (1000 bootstrapping replicates) were estimated with Nei and Gojobori's method [35] and with the Jukes and Cantor correction, in which $p < 0.05$ was considered significant.

Haplotype data also were generated using DnaSP v.6 and the haplotype network was constructed using PopArt v.1.7 with the median-joining algorithm [36] to explore the parasite relationships based on the *pvcyrpa* gene. Mutational steps represent the connections between haplotypes, and empty squares show the non-sampled or extinct haplotypes. The color of the circles represents the geographic origins of each haplotype, while the size of the circle represents the frequency of each haplotype.

2.8. Prediction of Linear B-Cell Epitopes

The prediction of linear B-cell epitopes was carried out using the ElliPro algorithm, as well as confirmed by the overlap between the predictions of at least two more algorithms (BCPred, BepiPred, ABCpred and Emini). This software takes a single sequence in FASTA format input and each amino acid receives a prediction score profile of known antigens and incorporates propensity scale methods based on hydrophilicity and secondary structure prediction. For each input sequence, the server outputs a prediction score. The positions of the linear B-cell epitopes are predicted to be located at the residues with the highest scores. In addition, the software ElliPro predicts linear and discontinuous antibody epitopes based on a protein antigen's 3D structure and accepts two types of input data: protein sequence or structure (PDB format) [37]. This server associates each predicted epitope with a score, defined as a PI (Protrusion Index) value averaged over epitope residues. In the method, residues with larger scores are associated with greater solvent accessibility.

3. Results

3.1. Molecular Characterization of the *Pvcyrpa* Gene in the Studied Regions

To identify the gene encoding the PvCyRPA in isolates from Brazilian endemic areas, 98 blood samples from *P. vivax*-infected individuals living in the cities of Cruzeiro do Sul, Mãnco Lima, Guajará, Manaus e Oiapoque had the DNA extracted and subjected to molecular diagnosis by conventional PCR.

The *pvcyrpa* sequence encodes 1101 bp with the two exons sequence and so it was divided into two regions (exon-1 and exon-2). The primer combinations (PvCyRPA_F1/R1 and PvCyRPA_F2/R2) designed to cover the length of the targeted *pvcyrpa* gene resulted in amplification of two fragments in 100% of samples (Figure 1). PvCyRPA F1/R1 primer combination amplified a fragment of 600 bp whereas PvCyRPA F2/R2 primer combination amplified a fragment of 466 bp. Additionally, *P. falciparum* specimens from in vitro culture were tested for quality assurance, resulting in negative PCR amplification of the *pvcyrpa* gene (Figure 1B). Therefore, the 98 samples from individuals infected with *P. vivax* amplified by PCR were subjected to sequencing reactions to screen the possible single nucleotide polymorphisms of the *pvcyrpa* gene. All amplified fragments were sequenced and aligned for sequence analysis.

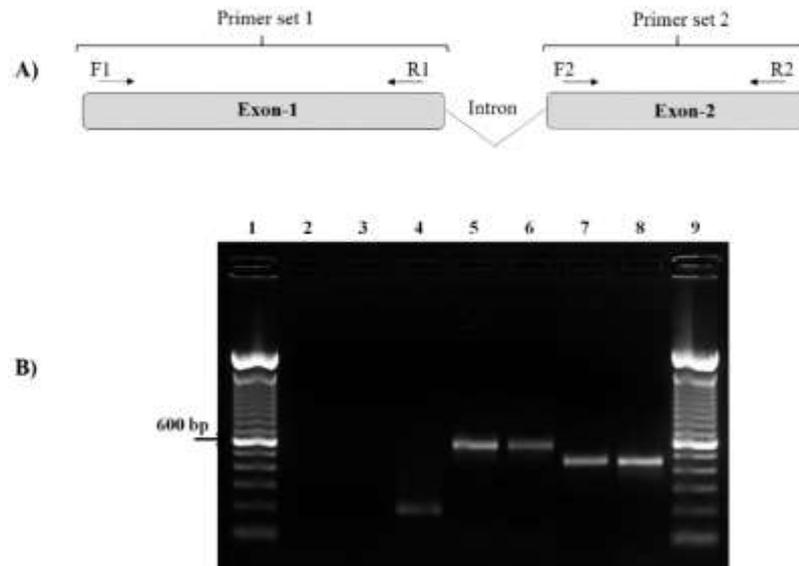


Figure 1. Molecular detection of the *pvcyrrpa* gene by PCR. (A) Schematic representation of *pvcyrrpa* gene, showing the fragments (exons 1 and 2) that were successfully amplified by two different primers sets (PvCyRPA F1/R1 and PvCyRPA F2/R2). (B) PCR amplification of the *pvcyrrpa* gene. The figure shows agarose gel of *pvcyrrpa* fragments amplified using PvCyRPA_F1/R1 primer and PvCyRPA_F2/R2 primer sets, respectively: Lane 1 and 9: 100 bp molecular marker; Lane 2: negative control (water); Lane 3: *P. fulciparum* in vitro culture (amplification with *pvcyrrpa* primers); Lane 4: *P. fulciparum* in vitro culture (amplification with *p126* primers); Lane 5 and 7: PCR positive control (*P. vivax* infected sample); Lanes 6 and 8: *P. vivax* samples.

3.2. Genetic Diversity of the *Pvcyrrpa* Gene

Compared to reference sequence Sal-1 (Gene ID: PVX_090240), 27 polymorphic sites were observed, of which one was synonymous and 26 were non-synonymous substitutions. In addition, the isolates presented a frequent deletion of a single codon in position E267 (Table 2). Of these non-synonymous substitutions, two amino acids positions showed two variant alleles each—Q142 (Q142K and Q142R) and D145 (D145G and D145N)—that sometimes were present together in one population. Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima presented the two variants existing in position Q142. As well as Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Manaus and Oiapoque also presented the two variants in position D145, except Guajará. The Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima regions shared all the 26 non-synonymous substitutions. Overall, R122K ($N = 80\%$; 82%), K131E ($N = 77\%$; 79%), D149G ($N = 62\%$; 63%), A154D ($N = 60\%$; 61%) and E159D ($N = 66\%$; 67%) SNPs were the most frequent in Brazilian Amazon isolates, while E86 ($N = 91\%$; 93%), Q142 ($N = 95\%$; 97%), A187 ($N = 92\%$; 94%) and V287 ($N = 91\%$; 93%) presented high frequency of similarity to the wild type sequence. N (%): Frequency of substitution in each locality (Table 2 and Figure 2).

Table 2. Polymorphisms in the PvCyRPA of *P. vivax* isolates from the Brazilian Amazon.

Sal-1 *	Substitutions †	Isolates					Total (98) N (%)
		CZS (31) N (%)	ML (17) N (%)	GJ (4) N (%)	MAO (37) N (%)	OIA (9) N (%)	
G69	G69A	12 (39%)	7 (41%)	2 (50%)	19 (51%)	3 (33%)	43 (44%)
E86	E86Q	4 (13%)	1 (6%)	0	0	2 (22%)	7 (7%)
T90	T90K	14 (45%)	10 (59%)	2 (50%)	19 (51%)	2 (22%)	47 (48%)
K93	K93E	14 (45%)	9 (53%)	2 (50%)	19 (51%)	3 (33%)	47 (48%)
H95	H95N	14 (45%)	9 (53%)	2 (50%)	19 (51%)	3 (33%)	47 (48%)
R122	R122K	24 (77%)	15 (88%)	4 (100%)	30 (81%)	7 (78%)	80 (82%)
E126	E126K	14 (45%)	7 (41%)	2 (50%)	17 (46%)	3 (33%)	43 (44%)
G127	G127E	14 (45%)	7 (41%)	2 (50%)	17 (46%)	2 (22%)	42 (43%)
I129	I129S	9 (29%)	6 (35%)	2 (50%)	11 (30%)	3 (33%)	31 (32%)
K131	K131E	23 (74%)	13 (76%)	4 (100%)	30 (81%)	7 (78%)	77 (79%)
Q142	Q142K	17 (53%)	8 (47%)	2 (50%)	15 (41%)	6 (67%)	48 (49%)
	Q142R	1 (3%)	2 (12%)	0	0	0	3 (3%)
D145	D145G	9 (29%)	6 (35%)	2 (50%)	11 (30%)	3 (33%)	31 (32%)
	D145N	8 (26%)	2 (12%)	0	6 (16%)	3 (33%)	19 (19%)
D149	D149G	23 (74%)	13 (76%)	4 (100%)	16 (43%)	6 (67%)	62 (63%)
K150	K150R	6 (19%)	5 (29%)	2 (50%)	0	0	13 (13%)
A154	A154D	20 (65%)	11 (65%)	4 (100%)	19 (51%)	6 (67%)	60 (61%)
E159	E159D	23 (74%)	14 (82%)	4 (100%)	19 (51%)	6 (67%)	66 (67%)
N170	N170D	12 (39%)	8 (47%)	2 (50%)	7 (19%)	0	29 (30%)
K185	K185E	10 (32%)	6 (35%)	2 (50%)	0 (0%)	1 (11%)	19 (19%)
A187	A187V	2 (6%)	2 (12%)	0	2 (5%)	0	6 (6%)
V220	V220I	2 (6%)	2 (12%)	0	13 (35%)	2 (22%)	19 (19%)
D232	D232N	9 (29%)	3 (18%)	3 (75%)	7 (19%)	3 (33%)	25 (26%)

D259	D259E	12 (39%)	8 (47%)	1 (25%)	18 (49%)	2 (22%)	41 (42%)
V260	V260E	12 (39%)	8 (47%)	1 (25%)	18 (49%)	2 (22%)	41 (42%)
T261	T261P	12 (39%)	8 (47%)	1 (25%)	18 (49%)	2 (22%)	41 (42%)
G264	G264S	14 (45%)	8 (47%)	1 (25%)	18 (49%)	2 (22%)	43 (44%)
E267	***	14 (45%)	8 (47%)	1 (25%)	18 (49%)	2 (22%)	43 (44%)
V287	V287I	4 (13%)	2 (12%)	0	1 (3%)	0	7 (7%)

* Reference Sequence Salvador-1; † Substitutions: The first letter represents the amino acid in the Sal-1 reference sequence and the last in bold the replacing amino acid; Study areas: CZS, Cruzeiro do Sul; ML, Mânso Lima; GJ, Guajará; MAO, Marau; OIA, Oiapoque. The number of samples per locality is indicated in parentheses; ***: Deletions of amino acid in position E267; N (%): Frequency of substitution in each locality.

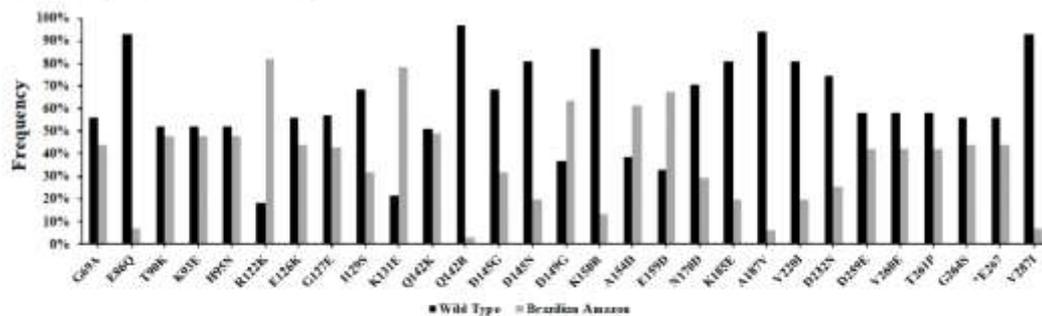


Figure 2. Frequency of substitutions in the PvCyRPA of *P. vivax* isolates from Brazilian Amazon. The two colors (black and gray) represent the two alleles within a population: reference allele and variant allele, respectively. The identification code represents the amino acid in the Sal-1 reference sequence (first character), followed by the position of this residue (number), and the replacing amino acid observed at the same position (last character).

3.3. Population Genetic Analysis

In *P. vivax* isolates from the Brazilian Amazon, the genetic diversity was heterogeneously distributed between the regions coding the two exons, with higher values for exon-1 comparing to exon-2 among localities (Table 3). Using the entire coding gene, it was shown that Mâncio Lima isolates had the highest nucleotide diversity (π) (0.01272 ± 0.00064), while Manaus had the lowest (0.01116 ± 0.00030). Oiapoque had the highest haplotype diversity (Hd) (1.000 ± 0.052), while Guajará had the lowest (0.833 ± 0.222). Some similar differences were detected when analyzing each exon separately. Concerning exon-1, the highest nucleotide diversity was also observed in the Mâncio Lima group (0.01517 ± 0.00095) among all five populations, while Manaus sequences displayed the lowest nucleotide diversity (0.01285 ± 0.00050). Moreover, parasites from Oiapoque presented the highest estimate of haplotype diversity (0.917 ± 0.092), whereas parasites from Guajará showed the lowest Hd (0.667 ± 0.204). In comparison to exon-2, the highest nucleotide diversity was observed in the Mâncio Lima group (0.00938 ± 0.00077). In contrast, Guajará sequences displayed the lowest nucleotide diversity (0.00792 ± 0.00420) in exon-2. Isolates from Oiapoque presented the highest estimate of haplotype diversity (Hd) (0.889 ± 0.091), whereas parasites from Guajará showed the lowest Hd (0.500 ± 0.265).

We performed the Tajima's D and Z-test to determine whether natural selection was affecting the *pvcrpa* gene. The Tajima's D (TjD) test was performed to assess if there is selective pressure on the *pvcrpa* gene and it was calculated using the total number of mutations. In coding regions, an excess of non-synonymous relative to synonymous changes suggests a clear signal of positive selection. The TjD test showed significant positive values for entire coding in Cruzeiro do Sul (2.24953 , * $p < 0.05$) and Manaus (2.75595 , ** $p < 0.01$). Similarly, for exon-1 in Cruzeiro do Sul (2.17555 , * $p < 0.05$), Guajará (2.24818 , * $p < 0.05$) and Manaus (2.60865 , ** $p < 0.01$) showed significant positive values, while the other locations showed no significant positive values. In contrast, the TjD test presented a significant positive value at exon-2 only in Manaus (2.42821 , * $p < 0.05$). The Z test of selection shows that the exon-1 sequence had positive values in parasites of different origins. These values were higher in all parasites except Guajará (Table 3).

Table 3. Diversity parameters and natural selection for the *pvcrpa* gene in *P. vivax* isolates from the Brazilian Amazon.

Diversity	Entire Coding	Exon-1	Exon-2
Cruzeiro do Sul (n = 31)			
No. of segregating sites (S)	32	22	10
No. of haplotypes (h)	20	11	11
Haplotype diversity (Hd)	0.955 ± 0.022	0.875 ± 0.031	0.867 ± 0.038
Nucleotide diversity (π)	0.01248 ± 0.00037	0.01489 ± 0.00050	0.00921 ± 0.00048
Tajima's test (D)	2.24953^*	2.17555^*	1.96672^{ns}
Tajima's test (Z)	0.774	1.330	0.884
Mâncio Lima (n = 17)			
No. of segregating sites (S)	32	22	10
No. of haplotypes (h)	11	8	5
Haplotype diversity (Hd)	0.926 ± 0.045	0.846 ± 0.062	0.750 ± 0.088
Nucleotide diversity (π)	0.01272 ± 0.00064	0.01517 ± 0.00095	0.00938 ± 0.00077
Tajima's test (D)	1.63472^{ns}	1.59064^{ns}	1.47204^{ns}
Tajima's test (Z)	1.014	1.391	0.743
Guajará (n = 4)			
No. of segregating sites (S)	20	13	7
No. of haplotypes (h)	3	2	2
Haplotype diversity (Hd)	0.833 ± 0.222	0.667 ± 0.204	0.500 ± 0.265

Nucleotide diversity (π)	0.01168 ± 0.00338	0.01444 ± 0.00442	0.00792 ± 0.00420
Tajima's test (D)	1.18178 ^m	2.24818 *	-0.81734 ^m
Tajima's test (Z)	0.502	0.686	0.440
Manaus (n = 37)			
No. of segregating sites (S)	27	18	9
No. of haplotypes (h)	19	11	6
Haplotype diversity (Hd)	0.943 ± 0.021	0.886 ± 0.031	0.818 ± 0.024
Nucleotide diversity (π)	0.01116 ± 0.00030	0.01285 ± 0.00050	0.00887 ± 0.00034
Tajima's test (D)	2.75595 **	2.60865 **	2.42821 *
Tajima's test (Z)	0.908	1.258	0.685
Oiapoque (n = 9)			
No. of segregating sites (S)	28	18	10
No. of haplotypes (h)	9	7	6
Haplotype diversity (Hd)	1.000 ± 0.052	0.917 ± 0.092	0.889 ± 0.091
Nucleotide diversity (π)	0.01136 ± 0.00113	0.01361 ± 0.00171	0.00830 ± 0.00233
Tajima's test (D)	0.74327 ^m	1.13901 ^m	-0.01607 ^m
Tajima's test (Z)	0.932	1.156	0.402

InDels were not included in the analysis; ^m not significant ($p > 0.10$); ^{m1} not significant ($0.10 > p > 0.05$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.4. Haplotype Network Analysis

The median-joining haplotype network constructed by PopArt 1.7 using the 98 sequences produced a total of 50 haplotypes with some of which consisting of more than one sequence from the Brazilian Amazon (Figure 3). The haplotype network to explore the parasite relationships based on the *pvcpyra* gene and comprising mutations at 34 segregating sites. All 50 haplotypes were found closely related. The haplotypes Hap_1 and Hap_11 had high frequency and shared parasites from all five localities. The haplotype Hap_4 (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima and Guajará) and Hap_8 (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima and Manaus) both shared parasites from three localities. Moreover, the haplotypes Hap_2 (Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima) and Hap_9 (Cruzeiro do Sul and Manaus), Hap_14 (Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima), Hap_23 (Manaus and Oiapoque) shared sequences from 2 localities. The other haplotypes had sequences from only one location.

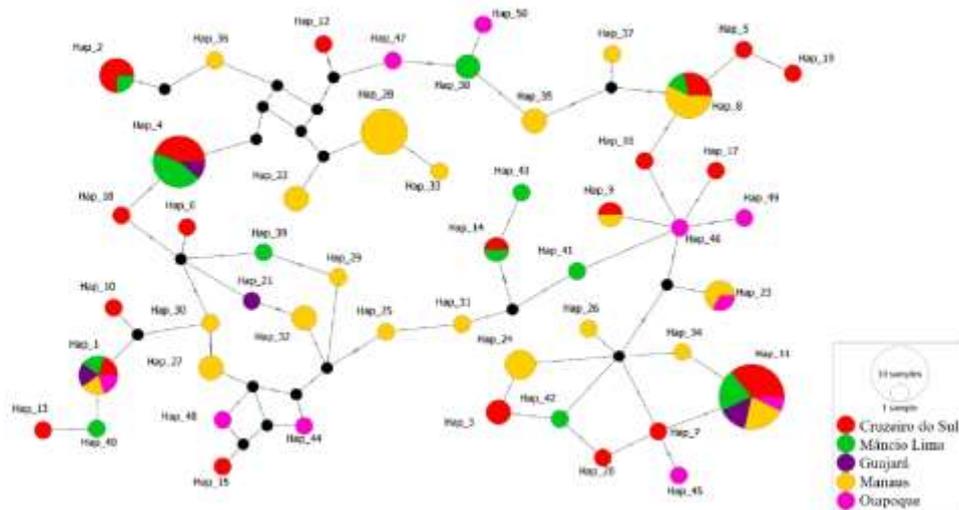


Figure 3. Median-joining network of *pvcyRPA* haplotypes. Each circle represents a unique haplotype and the color of the circles represents the geographic origins of each haplotype, while the size of the circle represents the frequency of each haplotype. Lines separating haplotypes represent mutational steps.

3.5. Comparison of Amino Acid Variations in PvCyRPA among Genome Sequences Available Worldwide

The PvCyRPA amino acid substitutions identified in genome sequences worldwide, including those from Brazilian Amazon, are resumed in Table 4. As observed in the protein sequence alignments, the PvCyRPA coding gene had an excess of non-synonymous mutations, which were more frequent in exon-1 than in exon-2. In addition, we subsequently aligned the protein sequence of these mutant field isolates with other hypothetical CyRPA proteins derivative from *P. vivax* genome data available in the GenBank database and also aligned with the isolate Mexico-Southern Mexican [23]. Among a total of 31 in PvCyRPA protein observed in *P. vivax* sequences worldwide, 26 amino acid substitutions are also present in our isolates. Interestingly, only our isolates showed a new substitution at K150R, being found in the localities of Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, and Guajará. In addition, we can observe a high genetic variability among the isolates of each locality. Curiously, Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima present the two variants existing in position Q142 when compared to the genome sequences. Additionally, Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Manaus and Oiapoque also presented the two variants in position D145, except Guajará. Likewise, some amino acid substitutions of the PvCyRPA protein were found but were rare in only some genomes: L180H in India VII; I63T and Y361H in North Korea; R125T and Q147K in SCO 66052.1 (Sanger Institute) (Table 4). Furthermore, we also compared the consensus sequences of our Brazilian Amazon isolates with reference sequence Sal-1 (PVX_090240) and P01 strain (PVP01_0532400) and generated the circular map of protein alignment using the software GenVision v15 (Lasergene DNASTAR) (Figure 4A). As expected, a significantly high degree of identity was observed across the sequences analyzed, maintaining the mutations found in relation to reference sequence Sal-1. The analysis showed a high identity among our isolates and P01 strain, despite the deletion of 4 amino acids present in the P01 sequence at positions 13–16 (FLF5). According to pairwise distance, the percent identity ranged from 94.5% (P01 vs. GJ) to 99.7% (CZS vs. OIA) (Figure 4A,B).

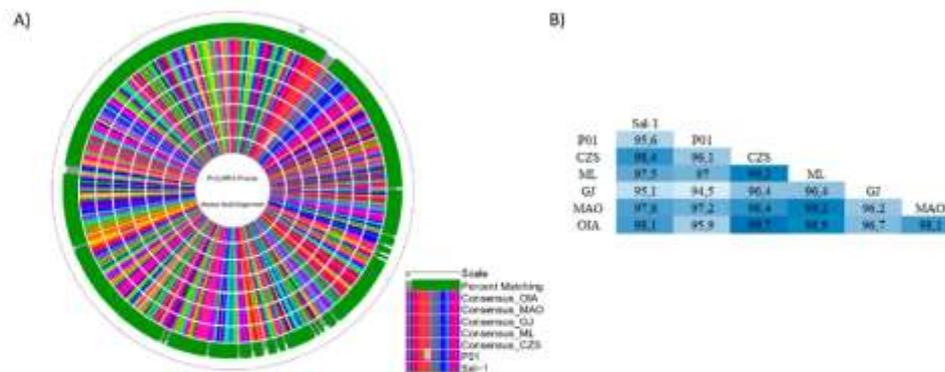


Figure 4. Homology analysis of PvCyRPA protein across isolates. (A) Circular alignment of amino acid sequences of PvCyRPA protein with reference sequence Sal-1 and P01 strain. The outer circle shows the amino acid scale. Green and gray bars on the second circle show the percent matching among all sequences used in the analysis. Inner circles show the sequence alignment in which each amino acid was represented by a different color. The legend presents the ordination to outer to inner rings: Scale; Percent Matching; Consensus OIA; Consensus MAO; Consensus GJ; Consensus ML; Consensus CZS; P01 strain; Sal-1 strain. (B) The pairwise distance among all sequences studied.

3.6. Polymorphisms and Potential B-Cell Epitopes

We performed in silico prediction for the identification of B cell epitopes present in the PvCyRPA protein using Sal-1 reference and then, seven amino acid sequences were predicted as linear epitopes, (Table 5). All epitopes were initially predicted by the Ellipro algorithm and were confirmed by the overlap between the predictions of at least two more algorithms (BCPred, BepiPred, ABCpred and Emini). The sequences varied from 9 to 19 amino acids and five sequences were inserted in conformational epitopes. The protein appears to have epitopes mainly in the central region and the C terminal region, while the N region terminal does not contain antigenic sequences. Of note, amino acid polymorphisms were detected in regions predicted to contain residues participating in B-cell epitopes (Table 6).

Table 5. B-cell epitope mapping of PvCyRPA (Salvador-1 Strain).

Sequence	Start	End	Length	Conformational Epitope	Overlapped Prediction				
					Ellipro	BCPred	ABCpred	BepiPred	Emini
PvCyRPA-B1	81	91	11	Yes	X	X	X	X	-
PvCyRPA-B2	119	129	11	No	X	-	X	X	X
PvCyRPA-B3	134	151	18	No	X	X	X	X	X
PvCyRPA-B4	181	192	12	Yes	X	-	-	X	X
PvCyRPA-B5	241	249	9	Yes	X	X	-	X	-
PvCyRPA-B6	257	272	16	Yes	X	X	-	-	X
PvCyRPA-B7	312	330	19	Yes	X	X	X	-	-

Full-length protein was analyzed for B-cell linear epitopes by the Ellipro algorithm, following confirmation by the overlap between the predictions of the algorithms BCPred, ABCpred, BepiPred, and Emini. (X): confirmed; (-): no confirmed.

Table 6. Predicted B cell epitopes of PvCyRPA and related polymorphisms.

Epitope	Sequence	Epitope
PvCyRPA ₍₈₁₋₁₃₁₎	Sal-1	INSTWETQTTL
	E86Q	INSTWQTQTTL
	T90K	INSTWETQTKL
	T90N	INSTWETQINL
PvCyRPA ₍₂₁₉₋₂₂₉₎	Sal-1	YKQRSKREGTI
	R122K	YKQKSKREGTI
	R125T	YKQRSKTEGTI
	E126K	YKQRSKRKGTI
	G127E	YKQRSKREGTI
	I129S	YKQRSKREGTS
PvCyRPA ₍₁₃₄₋₁₅₁₎	Sal-1	NSVTGITYQKEDVQIDKE
	Q142R	NSVTGITYRKEDVQIDKE
	Q142K	NSVTGITYKKEDVQIDKE
	Q142T	NSVTGITYTKEDVQIDKE
	D145G	NSVTGITYQKEDVQIDKE
	D145N	NSVTGITYQKENVQIDKE
	Q147K	NSVTGITYQKEDVKIDKE
	D149G	NSVTGITYQKEDVQIGKE
	K150R	NSVTGITYQKEDVQIDRE
PvCyRPA ₍₃₁₈₋₃₁₉₎	Sal-1	SYEYKTANKDNF
	K185E	SYEYETANKDNF

	A187V	SYEYKTVNKDNF
	A187P	SYEYKTPNKDNF
PvCyRPA _(R241-R249)	Sal-1	RISTNNTAR
	Sal-1	TLDVTNEGKKEYKFKC
	D259E	TLEVTNEGKKEYKFKC
PvCyRPA _(C257-C272)	V260E	TLDETNEGKKEYKFKC
	T261P	TLDVPNEGKKEYKFKC
	G264S	TLDVTNESKKEYKFKC
PvCyRPA _(T312-G330)	Sal-1	TEQNAIVVVKPKVQNDLNG

Sequences containing polymorphism inserted on predicted epitopes and marked in red letters.

4. Discussion

The invasion of the red blood cell by *Plasmodium* merozoites is essential for parasite survival and proliferation. The merozoites have therefore evolved multiple pathways, using various antigenic proteins which aid in the invasion process. Among the merozoite's invasive proteins are Cysteine-Rich Protective Antigen (CyRPA), which seems to be essential for the parasite's life cycle during the invasion of erythrocytes and a ligand for reticulocyte invasion [38]. The discovery of the antigen has revamped hope in the search for an effective malaria blood-stage vaccine of *P. vivax*. However, one of the major obstacles to malaria vaccine development is still the low efficiency of proteins used as immunogens in inducing protection, which, in part, can be explained by genetic polymorphisms [39]. It is important to understand the mechanisms of genetic recombination and sequence variation that represent the repertoire of polymorphic malarial surface antigens and that may help in designing vaccines [29,40]. The genetic diversity of these proteins in hyperendemic areas has been described as a limiting factor for the rapid acquisition of protective immunity and, consequently for the development of an effective vaccine. Furthermore, the antigenic polymorphism of *P. vivax* vaccine candidates has been little discussed in unstable transmission areas such as the Brazilian endemic regions [41]. Thus, considering that the epidemiology of malaria in Brazil presents unstable transmission and the knowledge about the genetic polymorphism of *pvcyrsa* remains unknown, we aimed to identify the *pvcyrsa* gene in isolates from different regions of the Brazilian Amazon and to study the potential impacts of the genetic diversity in potential B-cell epitopes.

The identification and analysis of the genetic diversity of the *pvcyrsa* gene in isolates from different geographic regions of the Brazilian Amazon have not been previously studied. Considering the distance among the studied localities and the possible existence of a gene flow of *Plasmodium vivax* genome among the studied populations, associated with migration of people, could promote the gene flow of the parasite [22] and impact the parasite transmission and dispersion [42,43]. Our first results showed that the *pvcyrsa* gene has high genetic variability in relation to reference sequence Sal-1, presenting 27 polymorphic sites of which one was synonymous and 26 non-synonymous substitutions throughout the sequence. Among these non-synonymous substitutions, two amino acids positions—Q142 (Q142K and Q142R) and D145 (D145G and D145N)—presented one or two variants in our study areas. Overall, R122K ($N = 80\%$; 82%), K131E ($N = 77\%$; 79%), D149G ($N = 62\%$; 63%), A154D ($N = 60\%$; 61%) and E159D ($N = 66\%$; 67%) mutations were the most frequent in our Brazilian Amazon isolates. The analysis of the *pvcyrsa* gene from the Brazilian Amazon showed that mutations have contributed to generating nucleotide and haplotype diversity. The similarity in the genetic diversity pattern suggests that similar evolutionary forces act on *pvcyrsa* parasites and that the structural and/or functional properties are consistent. To evade the immune response, genes encoding for antigenic proteins accumulate non-synonymous mutations, which leads to an increase in diversity. In this study, the *pvcyrsa* gene presented non-synonymous mutation accumulation in parasites of different regions, mainly in exon-1. Significant positive values of Tajima's *D* indicate balancing selection and population bottlenecks, while negative values suggest the

presence of purifying selection or population expansion [34]. Exon-1 had significant positive values in Cruzeiro do Sul, Guajará and Manaus for the Tajima's Test (T_jD) as well as in Manaus at exon-2. The results suggest that polymorphism at *pvcyrrpa* exon-1 is generated by mutation and recombination, and is probably maintained by positive balancing selection pressure, which might represent an evolutionary advantage to the parasite. Exon-1 codes for highly variant domains exposed on the surface of infected red blood cells (RBCs), while exon-2 codes for the more conserved segment [29]. Furthermore, the level of genetic diversity in blood-stage antigens seems to be associated with the degree of exposure to the immune system [29,44].

P. vivax biological and genetic characteristics, host immunity, and local vectors may contribute to their different patterns of demographic expansion [45]. Some discrete *P. vivax* lineages can remain stable across time in one of the areas with the highest malaria transmission in the Americas. Relapses can account for some clonal persistence because *P. vivax* strains are repeatedly reintroduced in the population as hypnozoites reactivate [46]. Maybe this context can be to explain why only Mâncio Lima and Oiapoque showed no significant positive values of Tajima's D . However, genomic epidemiology approaches can help better to reveal the complex distribution of this parasite in the Brazilian Amazon, as well as the relationships with the worldwide genetic diversity.

Moreover, it was possible to identify 50 different haplotypes of *pvcyrrpa* gene among the 98 *P. vivax* field isolates from the regions that were analyzed. The haplotype network explores the parasite relationships based on the *pvcyrrpa* gene and comprising mutations at 34 segregating sites, and confirmed the extensive genetic diversity observed in *pvcyrrpa* sequences. All 50 haplotypes were found to be closely related, with some of which consisting of more than one sequence from the Brazilian Amazon. Regarding the *pvcyrrpa* sequences, we observed that haplotypes Hap_1 and Hap_11 had high frequency and shared parasites from all five localities. These findings suggest a global distribution of parasites containing similar *pvcyrrpa* genotypes. Additionally, to compare our findings with the PvCyRPA sequences around the world, we observed that it presents a similar genetic profile among the complete genomes of *P. vivax* available on the GenBank Database. Among a total of 31 amino acid substitutions of PvCyRPA protein observed in *P. vivax* sequences worldwide, 26 amino acid substitutions are also present in our isolates.

To develop an effective malaria vaccine that can work in different regions of the world, it is important to include alleles that can induce the immune response and cover the antigenic diversity of *P. vivax* population. Consequently, the existence of the same haplotypes in different malaria-endemic areas and similar genetic profiles worldwide in their results will be important for the rationale of malaria vaccine designs. Moreover, as the immune system could act as selective pressure and the PvCyRPA is emerging as an alternative antigen in vaccine development, we also evaluated the impact of non-synonymous polymorphisms in relation to predicted B-cell epitope sequences.

Amino acid variation was present at peptide regions potentially participating in B-cell epitopes, which supports the idea that this molecule is under selective immune pressure. The seven B-cell potential epitopes have been identified in the PvCyRPA protein, most of which are contained in conformational epitopes, which corroborates its potential as an antibody target. A characteristic of malaria blood-stage antigens is their participation in merozoite invasion and immune evasion. Immunogenicity studies and molecular modeling are essential to determine the importance of PvCyRPA as a vaccine candidate. Targeting molecules important for the *Plasmodium* life cycle might be limited by their antigenic polymorphism or low immunogenicity. Molecular studies provide information about the dynamics of vaccine antigen polymorphisms that can be used to make informed decisions about which parasite alleles to include in vaccine formulations, and to evaluate accurately the efficacy of vaccines tested in malaria-endemic areas [21]. Thus, an effective antigen vaccine should include alleles that induce host immune responses that are sufficiently broad to cover the existing antigenic diversity. Nevertheless, because of the higher genetic diversity of *P. vivax* compared to *P. falciparum*, generating a broad cross-reactive

immune response against highly polymorphic asexual stage antigens faces even greater challenges [47].

5. Conclusions

In summary, the present study explored the genetic polymorphism of PvCyRPA in field isolates from distinct endemic areas in Brazil, showing a moderate sequence variation, which could influence the potential B-cell epitopes and, consequently, antibody recognition. Despite the observed amino acid changes in the studied population and sequences worldwide, the potential antibody targets did not seem to be significantly affected. However, due to the paucity of information on PvCyRPA genetic diversity and its potential as a vaccine candidate, more studies are necessary to confirm the impact of PvCyRPA polymorphism in naturally acquired immune response and/or vaccine development.

Author Contributions: Conceptualization, L.B.C. and J.d.C.L.-J.; Methodology, L.B.C. and G.d.O.G.; software, L.B.C. and J.d.C.L.-J.; validation, L.B.C.; formal analysis, L.B.C. and J.d.C.L.-J.; investigation, L.B.C.; resources, J.d.C.L.-J., D.M.B., C.T.D.-R. and R.L.D.M.; Visualization, R.N.R.-d-S.; writing—original draft preparation, L.B.C. and J.d.C.L.-J.; writing—review and editing, D.d.S.P.-d-S., D.M.B., P.R.R.T., C.T.D.-R., R.L.D.M., L.R.P.-R., C.T.D.-R. and J.d.C.L.-J.; supervision, J.d.C.L.-J.; project administration, J.d.C.L.-J.; funding acquisition, J.d.C.L.-J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FAPERJ (E26/202.854/2019—JCNE and E26/211.112/2019—Apoio a Grupos Emergentes de Pesquisa), Inovabio grant program (BIO-004-FIO-17-2-11—Bio-Manguinhos/Fiocruz) and FIOCRUZ (PAEF II, IOC-023-FIO-18-2-47). JCLJ and CTDR receive a Productivity Research Fellowship CNPq; JCLJ and PRRT are Jovem Cientista do Nosso Estado and CTDR is Cientista do Nosso Estado—FAPERJ. The Laboratório de Pesquisa em Malária (LPM, IOC, Fiocruz) is a National Institutes of Science & Technology (INCT) Associated Laboratory. The LPM is also an Associated Laboratory of the Neuroinflammation Network (FAPERJ). The APC was funded by Fiocruz.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Research Ethics Committee, CEP-Fiocruz CAAE 46084015.1.0000.5248/2016.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data supporting the conclusions of this article are provided within the article.

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. We are also indebted to the sequencing platform of the Program for Technological Development of Health Products (PDTIS-Fiocruz) for use of their facilities.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. W.H.O. *World Malaria Report 2020*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2020.
2. Dalrymple, U.; Mappin, B.; Gething, P.W. Malaria mapping: Understanding the global endemicity of *falciparum* and *vivax* malaria. *BMC Med.* **2015**, *13*, 140. doi:10.1186/s12916-015-0372-x.
3. da Silva-Nunes, M.; Moreno, M.; Conn, J.E.; Gamboa, D.; Abeles, S.; Vinetz, J.M.; Ferreira, M.U. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop.* **2012**, *121*, 281–291. doi:10.1016/j.actatropica.2011.10.001.
4. Saúde SdVeSMD. *Boletim Epidemiológico Malária*; Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde: Brasília, Brazil, 2021.
5. Hulden, L.; Hulden, L. Activation of the hypnozoite: A part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar. J.* **2011**, *10*, 90. doi:10.1186/1475-2875-10-90.
6. Cotter, C.; Sturrock, H.J.; Hsiang, M.S.; Liu, J.; Phillips, A.A.; Hwang, J.; Gueye, C.S.; Fullman, N.; Gosling, R.D.; Feachem, R.G. The changing epidemiology of malaria elimination: New strategies for new challenges. *Lancet* **2013**, *382*, 900–911. doi:10.1016/S0140-6736(13)60310-4.

7. Miller, L.H.; Baruch, D.I.; Marsh, K.; Doumbo, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **2002**, *415*, 673–679, doi:10.1038/415673a.
8. Mons, B.; Collins, W.E.; Skinner, J.C.; van der Star, W.; Croon, J.J.; van der Kaay, H.J. Plasmodium vivax: In vitro growth and reinvasion in red blood cells of Aotus nancymai. *Exp. Parasitol.* **1988**, *66*, 183–188, doi:10.1016/0014-4894(88)90089-6.
9. Kanjee, U.; Rangel, G.W.; Clark, M.A.; Duraisingh, M.T. Molecular and cellular interactions defining the tropism of Plasmodium vivax for reticulocytes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *46*, 109–115, doi:10.1016/j.mib.2018.10.002.
10. Mitchell, G.H.; Bannister, L.H. Malaria parasite invasion: Interactions with the red cell membrane. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **1988**, *8*, 225–310, doi:10.1016/s1040-8428(88)80011-8.
11. Favuzza, P.; Guffart, E.; Tamborrini, M.; Scherer, B.; Dreyer, A.M.; Rufer, A.C.; Emy, J.; Hoernschmeyer, J.; Thoma, R.; Schmid, G.; et al. Structure of the malaria vaccine candidate antigen CyRPA and its complex with a parasite invasion inhibitory antibody. *eLife* **2017**, *6*, e20383, doi:10.7554/eLife.20383.
12. Tamborrini, M.; Hauser, J.; Schafer, A.; Amacker, M.; Favuzza, P.; Kyungtak, K.; Fleury, S.; Pluschke, G. Vaccination with virosomally formulated recombinant CyRPA elicits protective antibodies against Plasmodium falciparum parasites in preclinical in vitro and in vivo models. *NPJ Vaccines* **2020**, *5*, 9, doi:10.1038/s41541-020-0158-9.
13. Favuzza, P.; Blaser, S.; Dreyer, A.M.; Riccio, G.; Tamborrini, M.; Thoma, R.; Matile, H.; Pluschke, G. Generation of Plasmodium falciparum parasite-inhibitory antibodies by immunization with recombinantly-expressed CyRPA. *Malar. J.* **2016**, *15*, 161, doi:10.1186/s12936-016-1213-x.
14. Dreyer, A.M.; Matile, H.; Papastogiannidis, P.; Kamber, J.; Favuzza, P.; Voss, T.S.; Wittlin, S.; Pluschke, G. Passive immunoprotection of Plasmodium falciparum-infected mice designates the CyRPA as candidate malaria vaccine antigen. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 6225–6237, doi:10.4049/jimmunol.1103177.
15. Franca, C.T.; White, M.T.; He, W.Q.; Hostetler, J.B.; Brewster, J.; Frato, G.; Malhotra, I.; Gruszczyn, J.; Huon, C.; Lin, E.; et al. Identification of highly-protective combinations of Plasmodium vivax recombinant proteins for vaccine development. *eLife* **2017**, *6*, e28673, doi:10.7554/eLife.28673.
16. Ndegwa, D.N.; Kundu, P.; Hostetler, J.B.; Marin-Menendez, A.; Sanderson, T.; Mwikali, K.; Verzier, L.H.; Coyle, R.; Adjalley, S.; Rayner, J.C. Using Plasmodium knowlesi as a model for screening Plasmodium vivax blood-stage malaria vaccine targets reveals new candidates. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1008864, doi:10.1371/journal.ppat.1008864.
17. Beeson, J.G.; Drew, D.R.; Boyle, M.J.; Feng, G.; Fowkes, F.J.; Richards, J.S. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 343–372, doi:10.1093/femsre/fuw001.
18. Crompton, P.D.; Pierce, S.K.; Miller, L.H. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 4168–4178, doi:10.1172/JCI44423.
19. Barry, A.E.; Amott, A. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 359, doi:10.3389/fimmu.2014.00359.
20. The malERA Consultative Group on Vaccines. A research agenda for malaria eradication: Vaccines. *PLoS Med.* **2011**, *8*, e1000398, doi:10.1371/journal.pmed.1000398.
21. Takala, S.L.; Plowe, C.V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: Preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. *Parasite Immunol.* **2009**, *31*, 560–573, doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01138.x.
22. de Souza-Neiras, W.C.; de Melo, L.M.; Machado, R.L. The genetic diversity of Plasmodium vivax—A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, *102*, 245–254, doi:10.1590/s0074-02762007000300002.
23. Gonzalez-Ceron, L.; Cebrian-Carmona, J.; Mesa-Valle, C.M.; Garcia-Maroto, F.; Santillan-Valenzuela, F.; Garrido-Cardenas, J.A. Plasmodium vivax Cysteine-Rich Protective Antigen Polymorphism at Exon-1 Shows Recombination and Signatures of Balancing Selection. *Genes* **2020**, *12*, 29, doi:10.3390/genes12010029.
24. Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M.V.; Brasil, P.; Ladislau, J.L.; Tauli, P.L.; Daniel-Ribeiro, C.T. Malaria in Brazil: An overview. *Malar. J.* **2010**, *9*, 115, doi:10.1186/1475-2875-9-115.
25. Chaves, L.B.; Perce-da-Silva, D.S.; Totino, P.R.R.; Riccio, E.K.P.; Baptista, B.O.; de Souza, A.B.L.; Rodrigues-da-Silva, R.N.; Machado, R.L.D.; de Souza, R.M.; Daniel-Ribeiro, C.T.; et al. Plasmodium vivax ookinete surface protein (Pvs25) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2019**, *73*, 287–294, doi:10.1016/j.meegid.2019.05.003.
26. Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Zhu, X.P.; Jarra, W.; Pinheiro, L.; do Rosario, V.E.; Thaithong, S.; Brown, K.N. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *61*, 315–320, doi:10.1016/0166-6851(93)90077-b.
27. Garrido-Cardenas, J.A.; Gonzalez-Ceron, L.; Manzano-Agugliaro, F.; Mesa-Valle, C. Plasmodium genomics: An approach for learning about and ending human malaria. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 1–27, doi:10.1007/s00436-018-6127-9.
28. Singh, V.; Gupta, P.; Pande, V. Revisiting the multigene families: Plasmodium var and vir genes. *J. Vector Borne Dis.* **2014**, *51*, 75–81.
29. Ferreira, M.U.; da Silva Nunes, M.; Wunderlich, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2004**, *11*, 987–995, doi:10.1128/CDLI.11.6.987-995.2004.
30. Pratt-Riccio, L.R.; Sallenave-Sales, S.; de Oliveira-Ferreira, J.; da Silva, B.T.; Guimaraes, M.L.; Santos, F.; de Simone, T.S.; Morgado, M.G.; de Simone, S.G.; Ferreira-Da-Cruz Mde, F.; et al. Evaluation of the genetic polymorphism of Plasmodium falciparum P126 protein (SERA or SERP) and its influence on naturally acquired specific antibody responses in malaria-infected individuals living in the Brazilian Amazon. *Malar. J.* **2008**, *7*, 144, doi:10.1186/1475-2875-7-144.

31. Burland, T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* **2000**, *132*, 71–91, doi:10.1385/1-59259-192-2:71.
32. Auburn, S.; Bohme, U.; Steinbiss, S.; Trimarsanto, H.; Hostetler, J.; Sanders, M.; Gao, Q.; Nosten, F.; Newbold, C.I.; Berriman, M.; et al. A new *Plasmodium vivax* reference sequence with improved assembly of the subtelomeres reveals an abundance of *pir* genes. *Wellcome Open Res.* **2016**, *1*, 4, doi:10.12688/wellcomeopenres.9876.1.
33. Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sanchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; Sanchez-Gracia, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 3299–3302, doi:10.1093/molbev/msx248.
34. Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **1989**, *123*, 585–595.
35. Nei, M.; Gojobori, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and non-synonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **1986**, *3*, 418–426, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410.
36. Bandelt, H.J.; Forster, P.; Rohlf, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **1999**, *16*, 37–48, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.
37. Ponomarenko, J.; Bui, H.H.; Li, W.; Fusseder, N.; Bourne, P.E.; Sette, A.; Peters, B. ElliPro: A new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, 514, doi:10.1186/1471-2105-9-514.
38. Knuepfer, E.; Wright, K.E.; Kumar Prajapati, S.; Rawlinson, T.A.; Mohring, F.; Koch, M.; Lyth, O.R.; Howell, S.A.; Villasis, E.; Snijders, A.P.; et al. Divergent roles for the RH5 complex components, CyRPA and RIPR in human-infective malaria parasites. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007809, doi:10.1371/journal.ppat.1007809.
39. Miller, L.H.; Roberts, T.; Shahabuddin, M.; McCutchan, T.F. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *59*, 1–14, doi:10.1016/0166-6851(93)90002-f.
40. Arnott, A.; Barry, A.E.; Reeder, J.C. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar. J.* **2012**, *11*, 14, doi:10.1186/1475-2875-11-14.
41. Ferreira, M.U.; Karunaweera, N.D.; da Silva-Nunes, M.; da Silva, N.S.; Wirth, D.F.; Hartl, D.L. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J. Infect. Dis.* **2007**, *195*, 1218–1226, doi:10.1086/512685.
42. Ferreira, M.U.; Castro, M.C. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar. J.* **2016**, *15*, 284, doi:10.1186/s12936-016-1335-1.
43. Souza, P.F.; Xavier, D.R.; Suarez Mutis, M.C.; da Mota, J.C.; Peiter, P.C.; de Matos, V.P.; Magalhaes, M.; Barcellos, C. Spatial spread of malaria and economic frontier expansion in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217615, doi:10.1371/journal.pone.0217615.
44. Renia, L.; Goh, Y.S. Malaria Parasites: The Great Escape. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 463, doi:10.3389/fimmu.2016.00463.
45. Rougeron, V.; Elguero, E.; Amathau, C.; Acuna Hidalgo, B.; Durand, P.; Houze, S.; Berry, A.; Zakeri, S.; Haque, R.; Shafiqul Alam, M.; et al. Human *Plasmodium vivax* diversity, population structure and evolutionary origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008072, doi:10.1371/journal.pntd.0008072.
46. de Oliveira, T.C.; Corder, R.M.; Early, A.; Rodrigues, P.T.; Ladeia-Andrade, S.; Alves, J.M.P.; Neafsey, D.E.; Ferreira, M.U. Population genomics reveals the expansion of highly inbred *Plasmodium vivax* lineages in the main malaria hotspot of Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008808, doi:10.1371/journal.pntd.0008808.
47. Neafsey, D.E.; Galinsky, K.; Jiang, R.H.; Young, L.; Sykes, S.M.; Saif, S.; Guja, S.; Goldberg, J.M.; Young, S.; Zeng, Q.; et al. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 1046–1050, doi:10.1038/ng.2373.

4.2 Artigo 2 (Pvs25) - *Plasmodium vivax* Ookinete Surface Protein (Pvs25) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon (209).

A proteína Pvs25 (*P. vivax* Ookinete Surface Protein) é uma das principais candidatas a vacina bloqueadora de transmissão da malária, em virtude de sua alta imunogenicidade em modelos animais, atividade de bloqueio de transmissão de anticorpos induzidos em ensaios clínicos e alta conservação entre os isolados de *P. vivax* de áreas endêmicas. No entanto, o polimorfismo no gene *pvs25* tem sido pouco estudado em áreas endêmicas da América do Sul. Nesse artigo, nós investigamos o polimorfismo genético de *pvs25* em isolados de *P. vivax* de cinco diferentes regiões da Amazônia Brasileira (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Guajará, Manaus e Oiapoque) e avaliamos o seu impacto na antigenicidade de epítomos de células B preditos, utilizando sequenciamento genético e ferramentas de predição de epítomos. Primeiramente, apenas uma substituição não sinônima foi encontrada no fragmento amplificado de 657 pb em todas as amostras sequenciadas. O que representou uma troca de Gln por Lys na posição 87 (Q87K) da sequência de aminoácidos da proteína (domínio II EGF-like). A substituição Q87K também esteve presente em todos os locais estudados com uma frequência total de 37,8%. Cruzeiro do Sul apresentou substituição Q87K em quase metade dos isolados (48,4%), e uma frequência expressiva (40,5%) também foi encontrada em Manaus, enquanto em Mâncio Lima, Guajará e Oiapoque, as frequências foram baixas (23,5%, 25% e 22,2% respectivamente). Também observamos a mutação Q87K em um epítomo predito de célula B, sem alterações significativas em sua antigenicidade. Em resumo, nossos dados sugerem que o gene *pvs25* é conservado entre isolados de diferentes regiões geográficas da Amazônia Brasileira, uma observação importante considerando a potencialidade do antígeno como candidato vacinal, a fim de cobrir distintas áreas endêmicas de *P. vivax* em todo o mundo.



Plasmodium vivax ookinete surface protein (Pvs25) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon



Lana Bitencourt Chaves^a, Daiana de Souza Perce-da-Silva^b, Paulo Renato Rivas Totino^b, Evelyn Kety Pratt Riccio^b, Barbara de Oliveira Baptista^b, Ana Beatriz Lopes de Souza^b, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva^a, Ricardo Luiz Dantas Machado^c, Rodrigo Medeiros de Souza^d, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro^b, Dalma Maria Banic^e, Lilian Rose Pratt-Riccio^b, Josué da Costa Lima-Junior^{b,*}

^a Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório de Pesquisa em Malária, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Brazil

^d Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro Multidisciplinar, Universidade Federal do Acre, Campus Floresta, Brazil

^e Laboratório de Imunologia Clínica, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Malaria
Plasmodium vivax
Pvs25
Genetic polymorphism
Antigenicity
Vaccine

ABSTRACT

The *Plasmodium vivax* Ookinete Surface Protein (Pvs25) is one of the leading malaria Transmission-Blocking Vaccine candidates based on its high immunogenicity in animal models, transmission-blocking activity of antibodies elicited in clinical trials and high conservation among *P. vivax* isolates from endemic areas. However, the polymorphism in gene encoding Pvs25 in endemic areas from South America has been poorly studied so far. Here, we investigated the genetic polymorphism of *pvs25* in *P. vivax* isolates from five different regions of the Brazilian Amazon (Cruzeiro do Sul, Mórão Lima, Guajará, Manaus and Oiapoque) and its impact on antigenicity of predicted B-cell epitopes using gene sequencing and epitope prediction tools. Firstly, only a non-synonymous substitution was found in the 657 bp amplified fragment in all sequenced samples, which represented an exchange of Gln by Lys at position 87 (Q87K) of protein amino acid sequence (domain II EGF-like). Q87K substitution was also present in all studied sites with a total frequency of 37.8%. Cruzeiro do Sul presented Q87K substitution in almost half of the isolates (48.4%), and an expressive frequency (40.5%) was also found in Manaus, while in Mórão Lima, Guajará and Oiapoque, the frequencies were low (23.5%, 25% and 22.2% respectively). We also observed the Q87K mutation in a predicted B-cell epitope of *pvs25*, with no significant changes on its putative antigenicity. Our data suggest that the *pvs25* gene is conserved among isolates from different Brazilian Amazon geographic regions, an important observation considering the antigen potentiality as a vaccine candidate to cover distinct *P. vivax* endemic areas worldwide.

1. Introduction

Malaria is still an infectious parasitic disease of great epidemiological importance in several countries of tropical and subtropical regions of the world. Thus, it is extremely important to establish alternative intervention strategies capable of controlling malaria transmission, such as the development of an effective vaccine. The different cell stages developed by *Plasmodium* over its complex life cycle offer a myriad of antigenic targets that can be considered for vaccine design, including antigens expressed during sexual stage occurring in the mosquito vector (Bennink et al., 2016). In this context, transmission-

blocking vaccine (TBV) has been considered an important strategy for malaria control by acting directly against the sexual and sporogonic stages of malaria parasites (Kilow, 1997) and, consequently, preventing mosquitoes from becoming infectious (Wu et al., 2015). Thus far, these suitable targets for TBV have generated promising results.

Different proteins from sexual stage have been characterized as TBV targets because antibodies against these proteins show transmission blocking activities (Sauerwein and Bouwema, 2015). Among these vaccine candidates, the 25kDa Ookinete Surface Protein (P25) has already been described in many *Plasmodium* species (Saxena et al., 2007). The P25 protein is specifically expressed on the surface of the

* Corresponding author.

E-mail address: josue@ioc.fiocruz.br (J.d.C. Lima-Junior).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.003>

Received 10 December 2018; Received in revised form 3 May 2019; Accepted 4 May 2019

Available online 08 May 2019

1567-1348/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

developing *Plasmodium* gametes, zygotes and ookinetes (Tsuboi et al., 1998). It is expressed before fertilization, reaching the peak of synthesis in the initial hours and later expressed in greater abundance on the surface of developing zygotes and ookinetes, being considered a post-activation target (del Carmen Rodríguez et al., 2000). This protein contains conserved structures, characterized by a secretory N-terminal signal sequence, four Epidermal Growth Factor (EGF)-like domains followed by a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor at the C-terminal end. It is also cysteine rich and highly constrained by up to 11 disulfide bonds (Kastow et al., 1988). Although P25 protein function has not yet been fully recognized, in *P. berghei*, it has been demonstrated that P25 protein has multiple, and partially redundant properties during ookinete and oocyst development. The protein is essential for the survival of ookinetes in the mosquito midgut and subsequent penetration of the midgut epithelium, and transformation into oocyst (Tomas et al., 2001).

Diverse platforms using sexual stage antigens as vaccine candidates demonstrated antibodies with transmission blocking activity (Carter et al., 2000). The Pvs25 has been considered one promising TB vaccine in development against *P. vivax*, as specific antibodies induced in immunized mice or Aotus monkeys completely block the ability of *P. vivax* to infect *Anopheles* mosquitoes (Hisaeda et al., 2000; Arevulo-Herrera et al., 2005). In humans, recombinant Pvs25 was recognized by antibodies from exposed populations in Myanmar (Kim et al., 2011). Currently, only Pfs25 and its orthologous protein in *Plasmodium vivax*, Pvs25, have been tested in Phase Ia clinical trials, its generates transmission blocking immunity in humans demonstrating the potential of this antigen as a component of a transmission blocking vaccine (Wu et al., 2008; Mañkin et al., 2005).

Differently from the extensive polymorphism commonly observed in several *Plasmodium* antigens, Pvs25 is considered conserved. Sequence analyses of *pvs25* revealed a similar structural organization though only 45% amino acid identity is observed (Tsuboi et al., 1998) and to date, genetic diversity of *pvs25* gene among different isolates has been surveyed in several Asian countries. However, no study on this polymorphism has been carried out in Brazilian malaria-endemic areas. A lack of understanding of *P. vivax* population structure and transmission dynamics is one of the key problems undermining effective malaria control. Population genetic studies are, therefore, important to define the diversity, distribution and dynamics of *P. vivax* populations, being important for contributing to malaria control interventions. In this study, we aimed to analyze the genetic diversity of *pvs25* gene in *P. vivax* isolates from different regions of the Brazilian Amazon.

2. Materials and methods

2.1. Study areas and blood sample collection

The study was carried out in five different regions of the Brazilian Amazon: *Cruzeiro do Sul*, *Mâncio Lima*, *Guajará*, *Manaus* and *Oiapoque* (Fig. 1). *Cruzeiro do Sul*, Acre State, located in the North Region of Brazil, with 82,622 inhabitants, presenting latitude of 07° 37' 52" and longitude of 72° 40' 12"; *Mâncio Lima*, Acre State, located in the North Region of Brazil, with 17,910 inhabitants, presenting latitude of 07° 36' 51" and longitude of 72° 53' 45"; *Guajará*, Amazonas State, with 14,074 inhabitants, presenting latitude of 2° 58' 19" and longitude of 57° 40' 39". The subset of *Manaus* and *Oiapoque* were previously described (Bitencourt Chaves et al., 2017).

Blood samples were collected from 98 *P. vivax*-infected individuals: 31 from *Cruzeiro do Sul*, 17 from *Mâncio Lima*, 4 from *Guajará*, 37 from *Manaus* and 9 individuals from *Oiapoque*. All *P. vivax* participants were enrolled according to the following criteria sought medical assistance for clinical malaria symptoms, presented uncomplicated malaria symptoms, were > 18 years of age, and had a positive *P. vivax* malaria diagnosis. Pregnant women, patients < 18 years of age, and *P. vivax*- and *P. falciparum*-infected individuals were excluded from the study.

Thin and thick blood smears were examined for the identification of the malaria parasite by a technician experienced in malaria diagnosis from the Brazilian Malaria Health Services. Thick blood smears from all the subjects were stained with Giemsa, and a total of 200 microscopic fields were examined under a 1000-fold magnification. Thin blood smears of the positive samples were examined for species identification. To increase the sensitivity of parasite detection, molecular analyses using specific primers for genus (*Plasmodium* sp) and species (*P. falciparum* and *P. vivax*) were performed in all the samples as previously described (Sounou et al., 1993). Donors positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated by the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

2.2. Ethics considerations

The study protocol of blood samples from *Cruzeiro do Sul*, *Mâncio Lima* and *Guajará* was reviewed and approved by the *Fundação Oswaldo Cruz* Research Ethics Committee, CEP-Fiocruz CAAE 46084015.1.0000.5248. In addition, the protocol of other blood sample collection was approved by the Research Ethics Committee of each locality: *Manaus* (CEP-Fiocruz): 346-613; *Oiapoque* (Hospital Municipal do Oiapoque/AP): 68980-000.

2.3. *P. vivax* DNA preparation and PCR amplification of *pvs25* gene

The DNA was extracted from blood samples using the QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol and, then, stored at -20°C until amplification. All the *pvs25* genes reported in this study were amplified by conventional polymerase chain reaction (PCR) using the following pair of primers (5'-3'): Pvs25F2 5'-CACCGACACAAAACTTAT-3' (AF083502, 158–177) and Pvs25R2 5'-AACGTAAAGCCTTCATACA-3' (AF083502, 814–795) described previously by Han et al., 2010 (Han et al., 2010). PCR reactions of the *pvs25* gene were carried out in 25 μl volume that included 3 μl of DNA, 10 pmol/ μl of each primer and the Master Mix kit (Promega) containing Taq DNA polymerase, PCR buffer and 10 mmol of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP, Promega, Madison, WI USA). The conventional PCR reaction was carried out using a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem) and the amplification conditions were as follows: one step at 95°C for 2 min; 30 cycles at 95°C for 1 min, 56°C for 1 min and 72°C for 1 min; and a last step at 72°C for 1 min. Ten μl of amplified products were size-fractionated by electrophoresis within 1.5% agarose gel (Sigma) in $1 \times$ TAE buffer (0.04 M TRIS-acetate, 1 mM EDTA) in the presence of $1 \times$ GelRed nucleic acid stain (Biotium). PCR products were visualized by ultraviolet (UV) illumination. Sizing of products was performed using a GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Then, PCR fragments were purified using the GE Healthcare Lifesciences kit by following the manufacturer's instructions and sequenced.

2.4. DNA sequencing and polymorphism analysis

The specificity of the assay was confirmed by sequencing the PCR products from all positive samples using a Big Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The DNA sequencing was carried out in a 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) and the results were analyzed using DNASTAR's sequence alignment software to identify polymorphism against the reference strain: Sal-1 *pvs25* (AF083502) from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). For worldwide analysis, the following sequences were used: Mexico – GenBank: ABS70906.1-ABS70935.1; Iran – GenBank: EU810766-EU810774, EU810766, EU810767, EU810768, EU810769, EU810770, EU810771, EU810772, EU810773, EU810774; India – GenBank: HM048519-HM048618, FJ490913-FJ490962, JF824132-JF824147; Indonesia – GenBank: AAV33639.1; North Korea: GenBank:

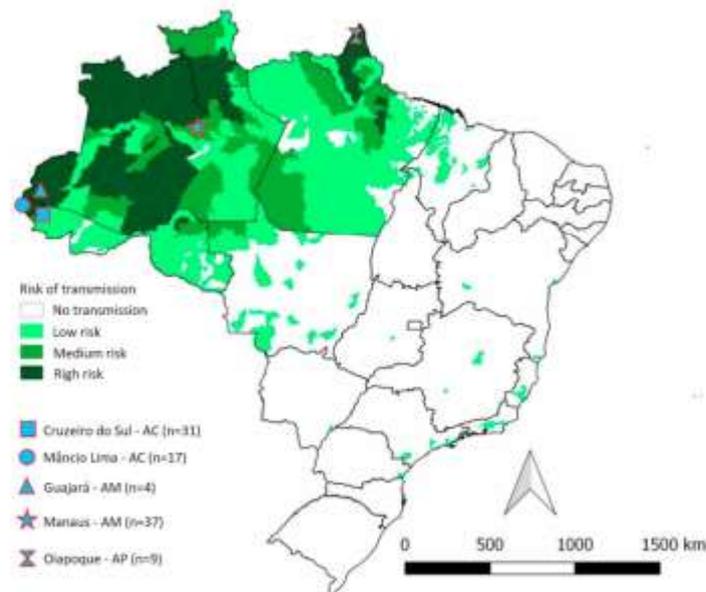


Fig. 1. Map showing the Malaria risk map by municipality of infection, Brazil, 2017 (SIVEP-Malaria).

AAV32640.1; South Korea: GenBank: GU971416-GU971611; Turkey: GenBank: ABG29073; Bangladesh - GenBank: BAA94348.1-BAA94350.1; Vietnam: GenBank: ABG29072; Thailand: GenBank: AB091729-AB091731.

2.5. Prediction of linear B-cell epitopes

Full-length protein sequence was subjected to BCPreds (<http://allab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html>), a prediction algorithm based learning methods of the machine, with the default threshold (75%). All sequences predicted as linear B-cell epitope (20-mer) were evaluated to antigenicity of using the VaxiJen algorithm (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). This 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. The results page lists the selected target, the protein sequence, its prediction probability, and a statement of protective antigen or non-antigen, according to a predefined cutoff (Threshold 0.4). The impact of non-synonymous mutations in all predicted epitopes was evaluated comparing the overall score of reference sequence and mutated sequences.

2.6. Prediction of conformational B-cell epitopes

To predict the conformational B-cell epitopes we analyzed the crystal structure of Pvs25 from *Plasmodium vivax* Sal-1, obtained from Protein Databank (PDB: 1Z27). This structure was analyzed by ElliPro web server (<http://tools.iedb.org/elliPro/>), using its default values (Minimum score: 0.5; Maximum distance: 6 Å). This server ElliPro predicts linear and discontinuous antibody epitopes based on a protein antigen's 3D structure. This server associates each predicted epitope with a score, defined as a PI (Protrusion Index) value averaged over epitope residues. In the method, residues with larger scores are associated with greater solvent accessibility. Discontinuous epitopes are

defined based on PI values and are clustered based on the distance R (in Å between residue's centers of mass). The larger R is associated with the larger discontinuous epitopes being predicted. (Ponomarenko et al., 2008)

2.7. Statistical analysis

Sequences were aligned using CLUSTAL X2 and the number of segregation sites (S), number of haplotypes (h), haplotype diversity (Hd), average number of differences (K), nucleotide diversity (π) were computed using DnaSP v6 (Rozas et al., 2003). The Tajima's D test (Tajima, 1989) for determining departure from the predictions of the neutral theory of evolution was also estimated with DnaSP v6. The genetic differentiation between populations was investigated evaluating the rate of fixation (F_{ST}) by analysis of molecular variance (AMOVA) implemented in ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010) and significances were estimated using 10,000 permutations. The significance level was adjusted by Bonferroni correction for multiple tests.

3. Results

3.1. Molecular characterization and sequence polymorphisms of the pvs25 gene

All *P. vivax* field isolates presented only one fragment corresponding to 657 base pair (bp). In addition to these samples, *P. falciparum* specimens were also tested, but proved negative for PCR amplification of the pvs25 gene. Thus, the 98 samples from individuals infected with *P. vivax* amplified by PCR were subjected to sequencing reactions to screen the possible single nucleotide polymorphisms of the gene encoding the Pvs25.

All 98 amplified fragments were sequenced and aligned for sequence analysis. Compared to reference sequence Sal-1 (AF083502), was not observed synonymous substitution, only one non-synonymous

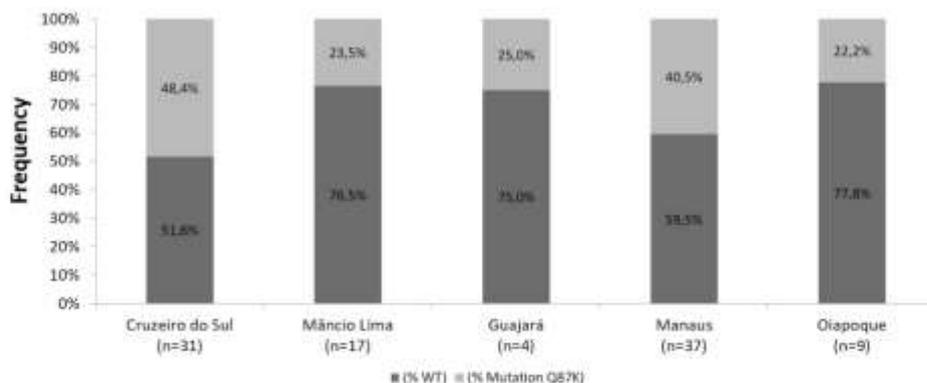


Fig. 2. Frequency of Q87K substitution in Pvs25 in *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon. The dark grey bar indicates the frequencies of wild type (compared with reference Sal-1 sequence) and the light grey bar indicates frequencies of the mutation Q87K.

substitution in the 657 bp amplified fragments was detected in all sequenced samples. The amino acid substitution Q87K, which represent the substitution of Gln to Lys at amino acid position 87 (EGF-like domain II), was identified with frequency of 37.8% of the isolates in the general population. In addition, regarding the areas studied, the substitution Q87K was present in *P. vivax* isolates collected in all localities. Despite being observed in all studied areas, the Q87K substitution was observed in higher frequencies in *Cruzeiro do Sul* (48.4%) and in *Manaus* (40.5%) when comparing with the frequencies observed in *Mâncio Lima* (23.5%), *Guajará* (25%) and *Oiapoque* (22.2%) (Fig. 2).

3.2. Population genetic analysis

The nucleotide diversity (π) for *pvs25* of 98 sequences analyzed was 0.00091. The highest nucleotide diversity was observed in the *Cruzeiro do Sul* group (0.00099). Among all 5 populations, *Mâncio Lima* sequences displayed the lowest nucleotide diversity (0.00073) followed by the *Oiapoque* group (0.00074) (Table 1). Similarly, parasites from *Cruzeiro do Sul* presented the highest estimate of haplotype diversity (Hd) (0.51613) whereas parasites from *Mâncio Lima* showed the lowest Hd (0.38235). Haplotype diversity was similar among the other studied areas, followed by the *Oiapoque* (0.38889). The Tajima's D test was performed to assess if there is selective pressure on the *pvs25* gene. The Tajima's D values ranged between -0.61237 and 1.66806 , tests showed no significant departures from neutrality in all studied areas, indicating no significant selection in the *pvs25* gene. Pairwise comparisons between each parasite population were performed using the F_{ST} statistics to check whether there was indicative of genetic differentiation between parasite populations, but all F_{ST} values were non-significant, suggesting lack of genetic differentiation between the studied populations (Table 2).

Table 1

Comparison of genetic diversity among isolates from Brazil.

	No. of sequences	No. of segregating sites (S)	No. of haplotypes (h)	Haplotype diversity (Hd)	Average number of differences (K)	Nucleotide diversity (π)	Tajima's test (D)
<i>Cruzeiro do Sul</i>	31	1	2	0.51613	0.51613	0.00099	1.63773
<i>Mâncio Lima</i>	17	1	2	0.38235	0.38235	0.00073	0.56551
<i>Guajará</i>	4	1	2	0.50000	0.50000	0.00096	-0.61237
<i>Manaus</i>	37	1	2	0.49550	0.49550	0.00095	1.59494
<i>Oiapoque</i>	9	1	2	0.38889	0.38889	0.00074	0.15647
All samples	98	1	2	0.47486	0.47486	0.00091	1.66806

Statistical significance: Not significant, $P > .10$.

Table 2

Genetic differentiation between samples from Brazil, measured by pairwise F_{ST} values.

	<i>Cruzeiro do Sul</i>	<i>Mâncio Lima</i>	<i>Guajará</i>	<i>Manaus</i>
<i>Cruzeiro do Sul</i>	-	-	-	-
<i>Mâncio Lima</i>	0.08591	-	-	-
<i>Guajará</i>	-0.03279	-0.2	-	-
<i>Manaus</i>	-0.01784	0.02444	-0.0985	-
<i>Oiapoque</i>	0.07847	-0.09250	-0.23077	0.01174

The F_{ST} values after Bonferroni correction.

3.3. Comparison of amino acid variations in Pvs25 among worldwide isolates

The Pvs25 amino acid substitutions identified in worldwide isolates including those from Brazilian Amazon are resumed in Table 3. Among a total of 17 variants of Pvs25 observed in *P. vivax* isolates worldwide, the H130T, mainly detected in Asian isolates, was the most common amino acid substitution. The Q87K substitution was present in our Brazilian isolates and in the North (Mexico) (Gonzalez-Ceron et al., 2010) and South American isolates (Colombia and Venezuela) (Escalante et al., 2005), as well as in Iran (Zakeri et al., 2009), Turkey (ABG29073) and Mauritania (Escalante et al., 2005). Amino acid residue E97Q was detected in some Asian isolates such as those from Iran (Zakeri et al., 2009), India (Prjapathi et al., 2011), Indonesia (Escalante et al., 2005), South Korea (Han et al., 2010), China (Feng et al., 2011), Bangladesh (Tsuboi et al., 2004) and Thailand (Sattabongkot et al., 2003), but was not found in American isolates. The Q131K substitution was present in some Asia isolates as well as in Oceanian and Papua New Guinea (PNG) (Escalante et al., 2005). The other amino acid variants of the *pvs25* gene were found but were rare in the countries.

Table 3
Comparison of amino acid variations in the *psv25* gene of *P. vivax* isolates between Brazilian Amazon and worldwide isolates.

Isolates	SS	EGF-1		EGF-2		EGF-3		EGF-4					THR	Reference					
	2	35	38	87	97	130	131	132	137	138	149	170	174		183	196	198	199	
Brazilian Amazon	Sal-1	N	L	M	Q	E	I	Q	S	C	A	K	C	E	E	S	S	V	Tauboi et al. (2004)
	Cruzeiro do Sul	-	-	-	Q/K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Present study
	Mãncio Lima	-	-	-	Q/K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Guajará	-	-	-	Q/K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Manaus	-	-	-	Q/K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
North America	Ocuipoque	-	-	-	Q/K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gonzalez-Crespo et al. (2010)
	Mexico	-	-	-	Q/K	-	L/T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Central America	Nicaragua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	Escalante et al. (2005)
	Honduras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	El Salvador	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Escalante et al. (2005)
South America	Colombia	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Venezuela	-	-	T	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Escalante et al. (2005)
Asia	Iran	-	-	-	Q/K	E/Q	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	India	-	-	-	-	E/Q	T	Q/K	-	G/W	A/G	-	-	E/K	E/K	S/F	S/T	V/E	Zakeri et al. (2009)
	Indonesia	-	-	-	-	Q	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Prasasti et al. (2011)
	North Korea	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	South Korea	N/D	-	-	-	E/Q	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Han et al. (2010)
	China	-	L/M	-	-	E/Q	T	Q/K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Turkey	-	-	-	K	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Feng et al. (2011)
	Bangladesh	-	-	-	-	E/K	T	Q/K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ABG24073
	Vietnam	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tauboi et al. (2004)
	Thailand	-	-	-	-	E/Q	T	Q/K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ABG2902
Oceania	PNG	-	-	-	-	-	T	K	R	-	-	N	-	-	-	-	-	-	Satubongkot et al. (2003)
Africa	Mauritania	-	-	-	K	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Escalante et al. (2005)
Overall = 19 countries	Sal-1	2	35	38	87	97	130	131	132	137	138	149	170	174	183	196	198	199	
	N countries (with substitution)	1	1	1	7	7	13	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	(% Frequency)	5%	3%	3%	37%	37%	65%	26%	3%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	

The amino acid variants of the *psv25* gene were compared to reference Sal-1 sequence (AF083502). SS, secretory signal sequence; EGF, EGF-like domain; THR, the C terminal hydrophobic region. • Indicates identical amino acid residues compared to the Salvador-1 strain.

3.4. Polymorphisms and potential B-cell epitopes

For becoming a good TBV vaccine candidate, the antigen must be hydrophilic and produce a strong B-cell mediated immunity. Full-length proteins were first analyzed for B-cell linear epitopes prediction using BCPred and all predicted B-cell epitopes were listed (Fig. 3). Four sequences of 20-mers (Pvs25: L53-A72, I80-Y99, I139-A158, L161-Q180) were predicted as linear B-cell epitopes on BCPreds. These four predicted epitopes presented high values of VaxiJen Score, which corroborate with their antigenicity (Table 4). Besides, the analyze of Pvs25 from *P. vivax* Sal-1 (PDB: 1Z27) by Ellipro server reveals 3 potential conformational epitopes (Table 5). Interestingly, all predicted B-cell linear epitopes were contained in conformational epitopes (Fig. 4), corroborating their potential as antibody targets.

About the polymorphism in predicted immunogenic epitopes of Pvs25, only the sequence ISENTCEFKNECKKETLGKA (Pvs25_{L53-A72}) was not inserted in a polymorphic region of protein. The polymorphic

sequence described in Nicaragua (Escalante et al., 2005) (LKCNTDNEVRKNVEGVYKQ), containing the SNP C170R, presented a higher combination of BCPred and VaxiJen score (Mean Score: 1.06) of all sequences identified on epitope Pvs25_{L161-Q180}. All polymorphic sequences identified on Pvs25 that were inserted in predicted epitopes presented no significant changes on predicted score (Table 4). Unfortunately, we cannot precise the real effect of mutations on structure and antigenicity of Pvs25 conformational epitopes, once that algorithms to identify these epitopes are dependents of 3D structure, which were only crystallographic to Pvs25 from *P. vivax* Sal-1. Despite this, in Fig. 4, we showed the location of predicted conformational epitopes and identified SNPs in 3D structure of Pvs25.

4. Discussion

Pvs25 is considered one important Transmission-Blocking Vaccine candidate. This protein is essential for the survival of ookinetes in the

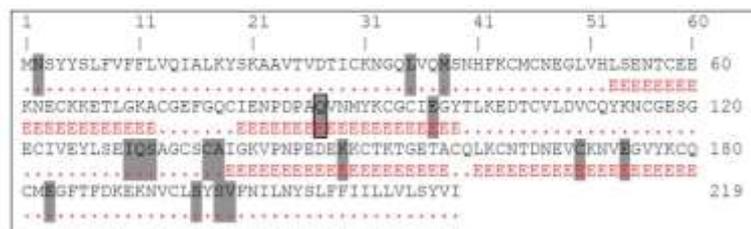


Fig. 3. B-cell epitope mapping of Pvs25 (Salvador Strain) using BCPred and VaxiJen. Predicted epitopes were represented by letter E, non-predicted epitopes represented by red dots and grey bars indicate the polymorphic sites found in our sequences and sequences available in database from malaria endemic areas worldwide. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 4
Influence of polymorphisms in predicted B cell epitopes.

Epitope	Sequence	Epitope	BCPred score	VaxJen score	Mean score	
Pvs25₍₃₂₃₋₄₇₂₎	Sal-1	LSENTCEERNBCKKKEFLGRA	1.00	1.20	1.10	
	Pvs25₍₃₈₉₋₄₈₆₎	Sal-1	IENPDPAQVNMYKCGGIEGY	0.95	0.65	0.80
		Q87K	IENPDPAKVNMYKCGGIEGY	0.95	0.70	0.82
		E97Q	IENPDPAQVNMYKCGGIEGY	0.93	0.62	0.77
		Q87K; E97Q	IENPDPAKVNMYKCGGIEGY	0.92	0.67	0.79
Pvs25₍₅₁₂₋₆₁₀₎	Sal-1	IGKVPNPEDEKCKTKTGETA	1.00	1.44	1.22	
	K149N	IGKVPNPEDEKCKTKTGETA	1.00	1.27	1.14	
	Pvs25₍₅₁₈₁₋₆₁₈₎	Sal-1	LKCNLDNEVCRNVEGVYKCCQ	0.95	0.76	0.85
C170R		LKCNLDNEVCRNVEGVYKCCQ	0.97	1.15	1.06	
E174K		LKCNLDNEVCRNVEGVYKCCQ	0.86	0.81	0.84	

The scores of BCPred and VaxJen were listed to predicted epitopes (Pvs25₍₃₂₃₋₄₇₂₎, Pvs25₍₃₈₉₋₄₈₆₎, Pvs25₍₅₁₂₋₆₁₀₎ and Pvs25₍₅₁₈₁₋₆₁₈₎). Sequences containing polymorphism inserted on predicted epitopes (Q87K, E97Q, C170R and E174K) were listed with their respective values of BCPred and VaxJen scores. The “Mean score” represent the mean value between BCPred and VaxJen.

Bold signifies the Sequences predicted as B-cell linear epitopes and inserted in conformational epitopes

mosquito midgut, penetration of the epithelium and transformation into oocysts (Tomas et al., 2001). However, the outstanding ability of *Plasmodium* in generating polymorphisms can culminate in immune evasion (Zakeri et al., 2009), which represents one of the major challenges for the development of a globally effective vaccine. Thus, one important strategy for malaria vaccine development is the identification and use of relatively conserved *Plasmodium* antigens. Therefore, identifying sequence variations in these candidate antigens may be helpful in designing an effective anti-malarial vaccine. Considering that the knowledge about the genetic polymorphism of *pvs25* in Brazilian Amazon areas remains unknown, we aimed to analyze this genetic diversity and to evaluate its potential impact in potential B-cell epitopes.

In our study, all the 98 field isolates from five different localities presented only one PCR fragment corresponding to 657 bp as seen in previous studies in other localities (Han et al., 2010). Sequencing analysis revealed that only Q87K substitution was found in the Brazilian isolates when comparing with reference Sal-1 strain. However, no work had yet been done in such diverse Brazilian endemic areas, and this is the first time that this mutation is described in *P. vivax* isolates from regions of east, middle and west of the Brazilian Amazon. The polymorphism was observed in all studied locations and the frequencies presented no statistical difference between the studied localities. In addition, this non-synonymous mutation has been previously reported in studies conducted in North (Mexico) (Gonzalez-Ceron et al., 2010) and South (Colombia and Venezuela) American isolates (Escalante et al., 2005) as also Iran (Zakeri et al., 2009), Turkey [ABG29073] and Mauritania (Escalante et al., 2005). Interestingly, in South America, the wild type genotype was found only in our studied areas. However, in sequences available worldwide, the Q and K genotypes at position 87 were also observed in isolates from Iran (Zakeri et al., 2009). This finding can corroborate the evidences that *P. vivax* in the Americas does not result from a single introduction into the continent (Taylor et al., 2013), and that some of the American haplotypes could derive from Asian populations (Comejo and Escalante, 2006; Culleton et al., 2011).

In order to compare our findings with the Pvs25 sequences around

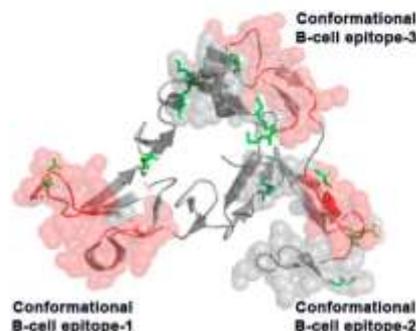


Fig. 4. Conformational epitopes and identified mutations in Pvs25 – 3D structure. Pvs25 representation as cartoon (grey), in which predicted conformational epitopes were represented by spheres. Predicted linear B-cell epitopes were located in conformational epitopes and were signaled by red spheres. Identified SNPs were represented by green sticks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the world, we also considered the frequencies of mutations in all continents. Despite the Q87K mutation is present in 5 out of 7 regions studied, the overall distribution of Pvs25 non-synonymous polymorphism was not restricted to this mutation. The comparison of our data and sequences available showed at list 17 variants in Pvs25 sequences observed in worldwide isolates. The frequencies of Pvs25 polymorphism in different countries ranged from 5% to 68%, being I130T (68%), Q87K (37%) and E97Q (37%) the most frequent polymorphism found globally. These data corroborate the studies of Chaurio et al., which suggested that some parasite haplotypes may have

Table 5
Conformational B-cell epitopes on Pvs25.

Epitope	Residues	Number of residues	Epitope score
1	K39, N40, E41, C42, K43, K44, E45, T46, L47, G48, K49, C57, I58, E59, N60, P61, D62, P63, A64, Q65, V66, N67, M68, Y69, K70	25	0.785
2	T3, V4, D5, T6, L139, K140, C141, N142, T143, D144, N145, E146, V147, K149, Q158, C159, M160, E161, G162, F163, T164, F165, D166, K167, E168, K169, N170, V171, C172, L173, G174, P175	32	0.679
3	E92, S93, C94, G95, E96, S97, E103, Y104, L105, S106, E107, H08, Q109, S110, A111, A116, H117, G118, K119, V120, F121, N122, P123, E124, D125, E126, K127, K128, C129, T130, K131, T132, G133, E134, T135	35	0.667

Mers that compound each Conformational epitope were listed as residues, where the letter indicates the one letter code of amino acid, and the number indicates the position of residue in the sequence. Sequences predicted as B-cell linear epitopes and inserted in conformational epitopes were highlighted by bold letters.

different geographic clusters (Chaurio et al., 2016). Moreover, even with good conservation rates, *pvs25* showed higher genetic variability compared to other sexual stage antigens reported in *P. vivax* as *pvs48/45* and the Willebrand factor A domain-related protein (WARP) (Chaurio et al., 2016), but lower polymorphisms when compared to well established vaccine candidates against sporozoites and merozoites, such as CSP and AMA-1 (Takala et al., 2009).

As observed in previous studies (Feng et al., 2011; Han et al., 2010), the EGF2 and EGF3 sites presented higher variability, and most conserved areas were located at EGF1 and EGF4 domains. Interestingly, Pvs25 the EGF2 and EGF3 like domains have been already described as sites targeted for blocking antibodies (Saxena et al., 2006). In addition, the EGF-like domains in the orthologous protein P625 have also shown immune blocking activity, indicating that the EGF2 domain might be a good target for TBV. Considering that an epitope corresponding to the B-cell receptor plays an important role in vaccine design aiming at antibody production, full-length Pvs25 were analyzed to determine whether SNPs in Pvs25 antigen are involved in antigenic regions and the potential impact of all observed polymorphisms in predicted B-cell epitopes. The four linear B-cell epitopes predicted in Pvs25 presented conservation degrees ranging from 90 to 95% between the epitope sequences of isolates and reference strain. However, only Pvs25₃₁₅₃₋₃₇₂₁ was fully conserved among our isolates, while the epitopes Pvs25₁₈₀₋₇₉₉, Pvs25₁₁₃₉₋₁₁₅₀ and Pvs25₁₃₁₆₁₋₁₄₁₀ presented similar prediction scores for reference and mutant epitopes. However, we cannot estimate the real effect of identified mutations in the recognition or affinity of specific antibodies against Pvs25, mainly due the low number of known monoclonal antibodies against Pvs25 of *P. vivax*. Besides, the observation that all mutate epitopes were still predicted as immunogenic suggest that, beyond the low selective pressure in this immunogenic regions and the limited polymorphism of TBV candidates compared to target antigens expressed in asexual stage parasites (Barry et al., 2009; Tsuboi et al., 1998; Kaslow et al., 1989; Shi et al., 1992). In fact, during this sexual stage, the expressed proteins may adapt to diverse micro-environments into the human and mosquito hosts where parasites have to go through in order to complete their life cycle (Moreno-García et al., 2014). It is also important to mention, that for *P. vivax* sexual antigens, the exposure to the immune system is expected to be longer than in *P. falciparum* due to the early appearance of *P. vivax* gametocytes in circulation (Vallejo et al., 2016). However, this increased exposure does not seem to result in relevant Pvs25 polymorphism (as a potential evasion mechanism) in response to a selective pressure exerted by the immune response to Pvs25, since the protein remains relatively conserved and immunogenic under natural conditions (Kim et al., 2011).

In summary, the present study explored the genetic polymorphism of *pvs25*, uncovered the amino acid substitution at the protein among Brazilian Amazon isolates and the frequent amino acid substitutions observed shared by American isolates. Despite the observed amino acid changes in natural populations worldwide, the antibody targets may not be significantly affected, since the genetic diversity of the Pvs25 vaccine candidate observed globally is limited and the predicted antigenicity was preserved.

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. We are also indebted to the sequencing platform of the Program for Technological Development of Health Products (PDTIS-Fiocruz) for use of their facilities. To Marcelo Urbano Ferreira, for the critical revision of the manuscript. CTDR, RLDM, JCLJ, received a "Research Productivity Fellowship" from the Brazilian National Research Council (CNPq) and CTDR and JCLJ are recipients of a grant from Faperj as *Cientista do Nosso Estado* and *Jovem Cientista do Nosso Estado*, respectively. This work was also funded by Inovabio grant program (BIO-004-FIO-17-2-11 – Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Author's contribution

Conceptualization: JdCLJ, LBC, DMB, LRPR.
 Formal analysis: LBC, JdCLJ, RNRdS.
 Investigation: LBC, DdSPdS, RNRdS.
 Methodology: LBC, RNRdS, DdSPdS, BJOB, ABLS.
 Resources: DMB, RLDM, PRRT, RMDs, CTDR, EKPR, JdCLJ.
 Writing – original draft: LBC, JdCLJ, RNRdS, CTDR.
 Writing – review & editing: DdSPdS, LRPR, RLDM, DMB, PRRT, EKPR, CTDR and RMDs.

References

- Arévalo-Herrera, M., Solarte, Y., Yanos, M.F., Castellanos, A., Rimón, A., Saul, A., Mu, J., Long, C., Miller, L., Herrera, S., 2005. Induction of transmission-blocking immunity in *Anopheles* mosquitoes by vaccination with a *Plasmodium vivax* clinical grade Pvs25 recombinant protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 32–37.
- Barry, A.E., Schultz, L., Buckle, C.O., Brady, J.C., 2000. Contrasting population structures of the genes encoding an leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 4, e9497.
- Beneš, S., Sisson, M.J., Pradel, G., 2016. The development of malaria parasites in the mosquito midgut. *Cell. Microbiol.* 18, 955–970.
- Bittencourt Chaves, L., Perce-da-Silva, D.S., Rodrigues-da-Silva, R.N., Martins da Silva, J.H., Camargo, G.C., Machado, R.L., Prati-Ricco, L.R., Bani, D.M., Lima-Junior, J.D., 2017. *Plasmodium vivax* cell traversal protein for Oskines and Sporozoites (PvCellTO) gene sequence and potential epitopes are highly conserved among isolates from different regions of Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0050344.
- Carter, R., Mendil, K.N., Miller, L.H., Molinero, L., Sain, A., 2000. Malaria transmission-blocking vaccines—how can their development be supported? *Nat. Med.* 6, 241–244.
- Chaurio, R.A., Pacheco, M.A., Cornejo, O.E., Durango, E., Stanley, J., C.E., Castillo, A.J., Herrera, S., Escalante, A.A., 2016. Evolution of the transmission-blocking vaccine candidates Pvs28 and Pvs25 in *Plasmodium vivax*: geographic differentiation and evidence of positive selection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004706.
- Cornejo, O.E., Escalante, A.A., 2006. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol.* 23, 558–563.
- Cullinan, R., Criban, C., Zeynek, F.V., Cravio, P., Raneke, A., Ramdhanu/vejojaja, M., Andriananjana, V., Kono, S., Farret, A., Arm, A.P., Sharp, P.M., Carter, R., Tanabe, K., 2011. The origin of African *Plasmodium vivax*: insights from mitochondrial genome sequencing. *PLoS One* 6, e29127.
- del Carmen Rodríguez, M., Grönlöf, P., Deserra, J., Kienrich, E., Schwartz, B.T., Simón, J.E., Margis, G., 2009. Characterization and expression of pvs25, a sexual and sporogonic stage-specific protein of *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 147–159.
- Escalante, A.A., Cornejo, O.E., Fieand, D.E., Poo, A.C., Durango, E., Collins, W.E., Lal, A.A., 2005. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* in a human malaria parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1900–1905.
- Estellor, L., Linder, H.E., 2010. *Adegan suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows*. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
- Feng, H., Zheng, L., Zhu, X., Wang, G., Fan, Y., Li, Y., Yang, Y., Lin, Y., Cai, L., Cao, Y., 2011. Genetic diversity of transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 in *Plasmodium vivax* isolates from Yunnan Province, China. *Parasit. Vectors* 4, 214.
- González-Crespo, L., Alvarado-Delgado, A., Martínez-Barnette, J., Rodríguez, M.H., Ovilla-Munoz, M., Perez, F., Hernandez-Avila, J.E., Sandoval, M.A., Rodríguez Mdel, C., Villarreal-Trivino, C., 2010. Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from southern Mexico and their association to local asphelazines infectivity. *Infect. Genet. Evol.* 10, 645–654.
- Han, E.Y., Lee, W.J., Sarathchandra, J., Jung, A.W., Han, M.H., An, S.S., Suh, I., Lim, C.S., 2010. Sequence polymorphisms of *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins (Pvs25 and Pvs28) from clinical isolates in Korea. *Tropical Med. Int. Health* 15, 1072–1076.
- Hierde, H., Swyers, A.W., Tsuboi, T., Collins, W.E., Sattabongkot, J.S., Sremskator, N., Trigg, M., Kaslow, D.C., 2000. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect. Immun.* 68, 6018–6023.
- Kaslow, D.C., 1997. Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int. J. Parasitol.* 27, 183–189.
- Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Baum, M.G., Krivak, D.B., Colligan, J.E., McCutchan, T.F., Miller, L.H., 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* 333, 74–76.
- Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Krivak, D.B., 1989. Minimal variation in a vaccine candidate from the sexual stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32, 101–103.
- Kim, T.S., Kim, H.H., Kim, J.Y., Kang, Y., Na, H.E., Liu, E., Moon, S.D., Kim, Y.J., Kwon, M.H., Sohn, Y., Kim, H., Lee, H.W., 2011. Comparison of the antibody response to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* antigens in residents of Mandalay, Myanmar. *Malar. J.* 10, 226.
- Malkin, E.M., Dunbar, A.P., Diament, D.J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, E., Long, C.A., Lambert, L., Miles, A.P., Wang, J., Swyers, A., Miller, L.H., Saul, A., 2005. Phase I vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 23, 3131–3138.
- Moreno-García, M., Deco-Tobora, B., Claudio-Pedraza, F., Lara-Mendoza, H., 2014. Injury and immune response applying the danger theory to malaria. *Front. Plant Sci.* 5,

- 451.
- Ponamarenski, J., Bai, H.H., Li, W., Fuxasler, N., Bourne, P.E., Sette, A., Preico, B., 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 9, 514.
- Prisiganti, S.R., Joshi, H., Iisa, V.K., 2011. Antigenic repertoire of *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccine candidates from the Indian subcontinent. *Malar. J.* 10, 111.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, B., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Saitobongkor, J., Tsuboi, T., Hiraeda, H., Tachihana, M., Sumanabun, N., Hengruang, T., Cao, Y.M., Stowers, A.W., Strichalimthop, J., Coleman, R.E., Torii, M., 2003. Blocking of transmission to mosquitoes by antibody to *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 despite antigenic polymorphism in field isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 536–541.
- Sauterwies, B.W., Rousseau, T., 2015. Transmission blocking malaria vaccines: assays and candidates in clinical development. *Vaccine* 23, 7475–7482.
- Setena, A.K., Singh, K., Sa, H.P., Klein, M.M., Stowers, A.W., Saul, A.J., Long, C.A., Garboczi, D.N., 2006. The essential mosquito-stage P25 and P28 proteins from *Plasmodium falciparum* form tile-like triangular prisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 90–91.
- Setena, A.K., Wu, Y., Garboczi, D.N., 2007. *Plasmodium* p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines. *Eukaryot. Cell* 6, 1265–1266.
- Shi, Y.P., Alpers, M.P., Pavesi, M.M., Lal, A.A., 1992. Single amino acid variation in the ookinete vaccine antigen from field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 179–180.
- Sinunsa, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., Jatta, W., Pinheiro, L., do Rosario, V.E., Thuitrong, S., Brown, K.N., 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 315–320.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Takala, S.L., Outhby, D., Thera, M.A., Batchelor, A.H., Cummings, M.P., Dyalanir, A.A., Quatara, A., Traore, K., Nangaly, A., Djimde, A.A., Doumbo, O.K., Plowe, C.V., 2009. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci. Transl. Med.* 1, 2ra25.
- Taylor, J.E., Pacheco, M.A., Baron, U.J., Beg, M.A., Machado, R.L., Faehrest, R.M., Herrera, S., Kim, J.Y., Meisard, D., Pavesi, M.M., Villegas, L., Muiyuan, A., Sunston, G., Cal, L., Zeyrek, P.Y., Escalante, A.A., 2013. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2050–2064.
- Tomas, A.M., Margos, G., Dimopoulos, G., von Lin, L.H., de Roning-Ward, T.F., Sinha, R., Lapetti, P., Beetsma, A.J., Rodriguez, M.C., Santos, M., Hager, A., Mendoza, J., Butcher, G.A., Kubiot, F., James, C.J., Womers, A.P., Sinden, R.E., 2001. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J.* 20, 3975–3983.
- Tsuboi, T., Kaslow, D.C., Gozz, M.M., Tachihana, M., Cao, Y.M., Torii, M., 1998. Sequence polymorphism in two novel *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. *Mol. Med.* 4, 772–782.
- Tsuboi, T., Kameko, O., Cao, Y.M., Tachihana, M., Yoshitomo, Y., Nagao, T., Kazum, H., Torii, M., 2004. A rapid genotyping method for the vivax malaria transmission-blocking vaccine candidates, Pvs25 and Pvs28. *Parasitol. Int.* 53, 211–216.
- Vallejo, A.F., Garcia, J., Amado-Garcia, A.B., Arevalo-Herrera, M., Herrera, S., 2016. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar. J.* 15, 48.
- Wu, Y., Ellis, R.D., Shaffer, D., Fellers, E., Walker, E.M., Mahanty, S., Fry, M.F., Suram, D., Rasoch, K., Miles, A.P., Arbig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., Miller, L.H., Durbin, A.P., 2008. Phase I trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* 3, e2636.
- Wu, Y., Sinden, R.E., Churcher, T.S., Tsuboi, T., Yushov, V., 2015. Development of malaria transmission-blocking vaccines: from concept to product. *Adv. Parasitol.* 80, 109–152.
- Zakeri, S., Razavi, S., Djadid, N.D., 2009. Genetic diversity of transmission blocking vaccine candidate (Pvs25 and Pvs28) antigen in *Plasmodium vivax* clinical isolates from Iran. *Acta Trop.* 109, 176–180.

5 DISCUSSÃO

Os estudos acerca do desenvolvimento de uma vacina antimalárica foram direcionados durante muito tempo, principalmente, para os antígenos únicos. No entanto, dada a complexidade do ciclo evolutivo do parasito, as complexas interações parasito-hospedeiro durante o curso da infecção, a extensa variabilidade genética do parasito e os mecanismos utilizados pelo *Plasmodium* para evadir da resposta imune do hospedeiro, uma vacina ideal contra a malária deveria ser direcionada contra vários antígenos expressos em diferentes estágios do desenvolvimento do parasito (284). As abordagens adotadas para desenvolver uma vacina antimalárica baseada em subunidades, multiantigênica, multiestágio e baseada em peptídeos sintéticos têm mostrado resultados promissores (285).

Nesse contexto, sabe-se que a diversidade antigênica exibida pelos parasitos da malária sempre foi um grande desafio para a produção de uma vacina eficaz. A montagem distinta de diferentes antígenos exibidos por diferentes estágios de desenvolvimento do parasito e suas interações com diferentes células hospedeiras fornecem uma variedade de alvos vacinais. Além disso, os polimorfismos observados em vários antígenos de malária e em diferentes cepas de parasitos exigem que uma vacina baseada em tais antígenos estimule respostas imunes capazes de fornecer proteção contra todos os parasitos predominantes. Dessa forma, é importante compreender os mecanismos acerca da variabilidade genética que envolvem o grande repertório de antígenos candidatos de malária e que podem ajudar na concepção de vacinas (118, 286).

Nesse sentido, uma vacina para o *P. vivax* constituída com diferentes epítomos talvez seja importante para a inibição completa da invasão e o desenvolvimento do parasito em diferentes fases do ciclo biológico, evento ainda pouco observado quando utilizados anticorpos para apenas uma região destas proteínas. Desse modo, a nossa expectativa é que a identificação de epítomos imunodominantes e conservados, seguida da construção quimérica recombinante e os respectivos testes com este novo antígeno potencialmente vacinal representando a PvCeITOS, PvCyRPA e Pvs25 combinadas sejam uma adição significativa à lista limitada de antígenos candidatos vacinais contra o *P. vivax*.

Baseado neste racional e considerando os diferentes trabalhos que apontam a proteína CelTOS (239, 241, 244), a proteína CyRPA (256-258) e a proteína P25 (277-281) como potenciais candidatas vacinais, nosso estudo objetivou identificar e caracterizar as sequências da PvCelTOS (dados anteriormente publicados no final do mestrado – **Artigo Anexo I**), PvCyRPA (presente estudo – **Artigo 1**) e Pvs25 (presente estudo – **Artigo 2**) de *P. vivax* em isolados brasileiros, analisar a variabilidade genética e avaliar o impacto nos epítomos de células B, gerando informações de grande importância para a construção de um antígeno quimérico potencialmente vacinal contra os três estágios de desenvolvimento do parasito no hospedeiro vertebrado (esporozoítos, merozoítos e oocinetos).

Destarte, o presente estudo explorou o polimorfismo genético da *pvcyrpa* mostrando uma variação moderada, o que poderia influenciar os potenciais epítomos de células B e, conseqüentemente, o reconhecimento de anticorpos. Apesar das alterações de aminoácidos observadas na população e sequências estudadas em todo o mundo, os potenciais alvos de anticorpos não parecem ser significativamente afetados. No entanto, devido à escassez de informações sobre a diversidade genética e o seu potencial como candidata vacinal, ainda são necessários mais estudos para confirmar o impacto do polimorfismo na resposta imune naturalmente adquirida, bem como no desenvolvimento de vacinas.

Considerando a distância entre as localidades estudadas e a possível existência de um fluxo gênico entre as populações estudadas de *P. vivax*, a migração de pessoas, poderia promover o fluxo gênico do parasito (93) e impactar a transmissão e dispersão do parasito (39, 287). Nossos primeiros resultados mostraram que o gene *pvcyrpa* apresenta alta variabilidade genética em relação à sequência de referência Sal-1, apresentando 27 sítios polimórficos sendo uma substituição sinônima e 26 substituições não sinônimas ao longo da sequência. Entre essas substituições não sinônimas, duas posições de aminoácidos - Q142 (Q142K e Q142R) e D145 (D145G e D145N) - apresentaram uma ou duas variantes em nossas áreas de estudo. No geral, R122K (N = 80%; 82%), K131E (N = 77%; 79%), D149G (N = 62%; 63%), A154D (N = 60%; 61%) e E159D (N = 66%; 67%) foram as mutações mais frequentes em nossos isolados brasileiros. A análise genética da *pvcyrpa* mostrou que mutações contribuíram para gerar diversidade de nucleotídeos e de haplótipos. A semelhança no padrão de diversidade genética

sugere que forças evolutivas semelhantes atuam sobre a *pvcyrrpa* e que as propriedades estruturais e/ou funcionais são consistentes.

Para fugir da resposta imune, genes que codificam proteínas antigênicas acumulam mutações não sinônimas, o que leva a um aumento da diversidade genética. De acordo com os nossos dados, o gene *pvcyrrpa* apresentou um acúmulo de mutações não sinônimas em parasitos de diferentes regiões, principalmente no éxon-1. Valores positivos significativos de Tajima indicam seleção balanceadora e gargalos populacionais, enquanto valores negativos sugerem a presença de seleção purificadora ou expansão populacional (288). O éxon-1 apresentou valores positivos significativos em Cruzeiro do Sul, Guajará e Manaus para o Teste de Tajima (TjD), bem como em Manaus no éxon-2. Os resultados sugerem que o polimorfismo no éxon-1 de *pvcyrrpa* é gerado por mutação e recombinação, e provavelmente é mantido por pressão seletiva positiva balanceadora, o que pode representar uma vantagem evolutiva para o parasito. O éxon-1 codifica domínios altamente variantes expostos na superfície das hemácias infectadas, enquanto o éxon-2 codifica o segmento mais conservado (286). Além disso, o nível de diversidade genética nos antígenos de estágio sanguíneo parece estar associado ao grau de exposição ao sistema imunológico (286, 289).

As características biológicas e genéticas do *P. vivax*, a imunidade do hospedeiro e os vetores locais podem contribuir com diferentes padrões de expansão demográfica (290). As recaídas podem ser responsáveis por alguma persistência clonal porque as cepas de *P. vivax* são reintroduzidas repetidamente na população à medida que os hipnozoítos são reativados (291). Talvez esse contexto possa explicar porque apenas Mâncio Lima e Oiapoque não apresentaram valores positivos significativos no teste Tajima. No entanto, abordagens de epidemiologia genômica podem ajudar a revelar melhor a complexa distribuição desse parasito na Amazônia Brasileira, bem como as relações com a diversidade genética mundial.

Além disso, foi possível identificar 50 haplótipos diferentes do gene *pvcyrrpa* entre os 98 isolados das regiões analisadas. A rede de haplótipos explora as relações parasitárias com base no gene *pvcyrrpa* e compreendendo mutações em 34 sítios segregantes, e confirmou a extensa diversidade genética observada nas sequências genéticas. Todos os 50 haplótipos foram encontrados intimamente

relacionados, com alguns dos quais consistindo em mais de uma sequência da Amazônia Brasileira. Em relação às sequências de *pvcyrpa*, observamos que os haplótipos Hap_1 e Hap_11 apresentaram alta frequência e compartilharam parasitos de todas as cinco localidades. Esses achados sugerem uma distribuição global de parasitos contendo genótipos semelhantes de *pvcyrpa*. Além disso, ao comparar nossos achados com as sequências de PvCyRPA ao redor do mundo, observamos que ela apresenta um perfil genético semelhante entre os genomas completos de *P. vivax* disponíveis no banco de dados GenBank. Entre um total de 31 substituições de aminoácidos da proteína PvCyRPA observadas em sequências de *P. vivax* em todo o mundo, 26 substituições também estão presentes em nossos isolados.

A variação de aminoácidos estava presente em regiões potencialmente preditas como epítomos de células B, o que sustenta a ideia de que essa proteína está sob pressão imunológica seletiva. Os 7 epítomos potenciais de células B foram identificados na proteína PvCyRPA, a maioria dos quais estão contidos em epítomos conformacionais, o que corrobora seu potencial como alvo de anticorpo. Uma característica dos antígenos do estágio sanguíneo da malária é sua participação na invasão de merozoítos e evasão imune. Estudos de imunogenicidade e modelagem molecular são essenciais para determinar a importância da PvCyRPA como candidata vacinal.

Em relação aos antígenos sexuais de *P. vivax*, é importante mencionar que se espera uma exposição mais longa ao sistema imunológico devido ao aparecimento precoce de gametócitos de *P. vivax* na circulação, quando comparado ao *P. falciparum* (83). No entanto, essa exposição aumentada não parece resultar em uma variabilidade relevante em relação a *pvs25*, ou em um potencial mecanismo de evasão, em resposta a uma pressão seletiva exercida pela resposta imune, uma vez que a proteína permanece relativamente conservada e imunogênica em condições naturais (279). O presente estudo explorou a sua variabilidade genética, identificou a substituição de aminoácidos na proteína entre os isolados da Amazônia Brasileira e as frequentes substituições de aminoácidos observadas compartilhadas por isolados americanos. Apesar das alterações de aminoácidos observadas em populações naturais no mundo, os alvos de anticorpos podem não ser significativamente

afetados, uma vez que a variabilidade genética da proteína Pvs25 observada globalmente é limitada e a antigenicidade é preservada.

Nossos resultados mostraram que todos os 98 isolados de cinco localidades diferentes apresentaram apenas um fragmento de PCR correspondente a 657 pb como visto em estudos anteriores da Pvs25 em outras localidades (292). A análise de sequenciamento genético revelou que apenas a substituição de Q87K foi encontrada nos isolados brasileiros quando comparados com a cepa de referência Sal-1. No entanto, nenhum trabalho havia sido feito em áreas endêmicas brasileiras, e esta é a primeira vez que esta mutação é descrita em isolados de *P. vivax* de regiões do leste, oeste e central da Amazônia Brasileira. O polimorfismo foi observado em todas as localidades estudadas e as frequências não apresentaram diferença estatística entre as localidades estudadas. Além disso, essa mutação não sinônima foi relatada anteriormente em estudos realizados em isolados americanos do Norte (México) (293) e do Sul (Colômbia e Venezuela) (294) como também Irã (295), Turquia [ABG29073] e Maurtânia (294). Curiosamente, na América do Sul, o genótipo selvagem foi encontrado apenas em nossas áreas estudadas. No entanto, em sequências disponíveis em todo o mundo, os genótipos Q e K na posição 87 também foram observados em isolados do Irã (295). Este achado pode corroborar as evidências de que as populações de *P. vivax* nas Américas não resultam de uma única introdução no continente (296), e que alguns dos haplótipos americanos podem derivar de populações asiáticas (297, 298).

Para comparar os nossos resultados com as sequências de Pvs25 ao redor do mundo, também consideramos as frequências de mutações em todos os continentes. Apesar da mutação Q87K estar presente em 5 das regiões estudadas, a distribuição geral do polimorfismo não sinônimo não se restringiu a essa mutação. A comparação dos nossos dados e sequências disponíveis revelou 17 variantes observadas nos isolados mundiais. As frequências dos polimorfismos em diferentes países variaram de 5% a 68%, sendo I130T (68%), Q87K (37%) e E97Q (37%) os polimorfismos mais frequentes encontrados globalmente. Esses dados corroboram com os estudos de Chaurio e colaboradores, em 2016, que sugeriram que alguns haplótipos de parasitos podem ter diferentes agrupamentos geográficos (299). Além disso, mesmo com bons índices de conservação, Pvs25 apresentou maior variabilidade genética em comparação com outros antígenos do estágio sexual

relatados em *P. vivax* como Pvs48/45 e Warp (von Willebrand Factor A domain-related protein) (299), mas em contrapartida apresentou menor variabilidade genética quando comparado a candidatos vacinais bem estabelecidos contra esporozoítos e merozoítos, como CSP e AMA-1 (114).

Conforme observado em estudos anteriores (292, 300), os domínios EGF-2 e EGF-3 apresentaram maior variabilidade, sendo que a maioria das áreas conservadas estava localizada nos domínios EGF-1 e EGF-4. Curiosamente, os domínios EGF-2 e EGF-3 já foram descritos como sítios direcionados para bloquear anticorpos (301). Além disso, o domínio EGF-like da proteína ortóloga Pfs25 também mostrou atividade de bloqueio, indicando que o domínio EGF-2 pode ser um bom alvo para TBV. Considerando que um epítipo correspondente ao receptor de células B desempenha um papel importante no desenho de vacina, visando a produção de anticorpos foi investigado se os SNPs no antígeno Pvs25 estão envolvidos em regiões antigênicas, bem como o impacto potencial de todos os polimorfismos observados em epítipos de células B preditos. Os quatro epítipos lineares de células B preditos da Pvs25 apresentaram graus de conservação variando de 90% a 95% entre as sequências de epítipos dos isolados e cepa de referência. No entanto, apenas Pvs25_(L53-A72) foi totalmente conservado entre nossos isolados, enquanto os epítipos Pvs25_(I80-Y99), Pvs25_(I139-A158) e Pvs25_(L161-Q180) apresentaram escores de predição semelhantes para epítipos de referência e mutantes. Além disso, a observação de que todos os epítipos mutados ainda eram preditos como imunogênicos sugerem a baixa pressão seletiva nestas regiões imunogênicas e do polimorfismo limitado dos candidatos a TBV em relação aos antígenos alvo expressos em parasitos de estágio assexuado (263, 302-304).

Por fim, para desenvolver uma vacina eficaz contra a malária que possa funcionar em diferentes regiões do mundo, é importante incluir alelos que podem induzir a resposta imune e cobrir a diversidade antigênica da população de *P. vivax*. Estudos moleculares fornecem informações sobre a dinâmica dos polimorfismos de antígenos candidatos vacinais que podem ser usados para decisões sobre quais alelos do parasito incluir nas formulações e avaliar com precisão a eficácia das vacinas testadas em áreas endêmicas de malária (305). Assim, uma vacina antigênica eficaz deve incluir alelos que induzam respostas imunes do hospedeiro que sejam suficientemente amplas para cobrir a diversidade antigênica existente. No

entanto, os desafios são ainda maiores devido à maior diversidade genética de *P. vivax*, em comparação com *P. falciparum* (96).

6 PERSPECTIVAS

- Reunir todos os dados obtidos neste projeto, somados à predição *in silico* dos epítomos de células T presentes na proteína PvCyRPA (realizado em paralelo pelo nosso grupo em outro projeto);
- Desenhar, sintetizar o gene e expressar a quimera recombinante representando apenas as regiões imunodominantes da PvCeITOS, PvCyRPA e Pvs25 fusionadas;
- Avaliar a reatividade de anticorpos IgG (IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM de indivíduos naturalmente expostos à malária frente a quimera recombinante multiestágio;
- Avaliar a relação entre a resposta imune celular e humoral observada e os fatores de exposição/proteção nos indivíduos participantes do estudo visando à confirmação do potencial vacinal.

7 CONCLUSÕES

Nossos dados mostram principalmente que:

- Os genes que codificam as proteínas PvCyRPA e Pvs25 foram identificados em 100% das nossas amostras estudadas;
- A proteína PvCyRPA possui uma alta variabilidade genética nos isolados brasileiros, apresentando 26 mutações não sinônimas ao longo de toda sequência, no entanto apresenta o mesmo perfil genético entre os genomas completos disponíveis no GenBank e isolados de *P. vivax* do México;
- O polimorfismo genético do éxon-1 na *pvcyrpa* é gerado por mutação e recombinação, e provavelmente é mantido pela pressão seletiva positiva balanceadora;
- O éxon-1 da *pvcyrpa* codifica um segmento mais polimórfico, enquanto o éxon-2 codifica um segmento mais conservado;
- Foram identificados 7 epítomos de células B na proteína PvCyRPA, estando a maioria contidos em epítomos conformacionais, o que corrobora o seu potencial como alvo de anticorpos.
- O gene *pvs25* é altamente conservado entre os isolados de diferentes regiões da Amazônia Brasileira apresentando apenas uma mutação não sinônima;
- A mutação não sinônima Q87K presente na Pvs25 foi observada em todas as localidades estudadas e as frequências não apresentaram diferença estatística;
- Essa mutação não sinônima Q87K presente nos nossos isolados também já foi encontrada em isolados de outros 4 continentes do mundo;
- Os polimorfismos encontrados na Pvs25 parecem não impactar significativamente o potencial antigênico dos epítomos identificados por predição *in silico*;

- Ainda são necessários mais estudos para confirmar o impacto desses polimorfismos das proteínas na resposta imune naturalmente adquirida, bem como no desenvolvimento de vacinas contra a malária.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saúde SdVeSMd. Boletim Epidemiológico malária. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde; 2021 Abril. 2021.
2. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(4):564-94.
3. Nerlich A. Paleopathology and Paleomicrobiology of Malaria. *Microbiology spectrum*. 2016;4(6).
4. 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.
5. 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.
6. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & vectors*. 2010;3(1):5.
7. 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).
8. Mangano VD, Modiano D. An evolutionary perspective of how infection drives human genome diversity: the case of malaria. *Current opinion in immunology*. 2014;30:39-47.
9. Stephen L Hoffman CCKC, Nicholas J white. *Tropical Infectious Diseases*. Third edition ed2011. 1156 p.
10. Ramasamy R. Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. *Frontiers in public health*. 2014;2:123.
11. W.H.O. World Malaria Report. 2016.
12. Collins WE. Primate malarias. *Adv Vet Sci Comp Med*. 1974;18(0):1-23.
13. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2012;5:69.
14. Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on Anopheles: what makes a malaria vector? *Trends Parasitol*. 2010;26(3):130-6.
15. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria journal*. 2010;9:115.
16. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasites & vectors*. 2010;3:72.
17. WHO. World Malaria Report 2021. 2021.
18. Menkin-Smith L, Winders WT. *Plasmodium Vivax Malaria*. StatPearls. Treasure Island (FL)2020.
19. Capela R, Moreira R, Lopes F. An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22).
20. Park JW, Jun G, Yeom JS. *Plasmodium vivax malaria: status in the Republic of Korea following reemergence*. *Korean J Parasitol*. 2009;47 Suppl:S39-50.
21. Antonio-Nkondjio C, Ndo C, Njiokou F, Bigoga JD, Awono-Ambene P, Etang J, et al. Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):501.

22. Rahimi BA, Thakkestian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, Choekjindachai W. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malar J.* 2014;13:481.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Organization WH. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. 2020.
27. 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.
28. 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 neglected tropical diseases.* 2010;4(8):e774.
29. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in Plasmodium vivax relapse. *Malaria journal.* 2014;13:144.
30. 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.
31. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nature reviews Disease primers.* 2017;3:17050.
32. Langhi DM, Jr., Bordin JO. Duffy blood group and malaria. *Hematology.* 2006;11(5):389-98.
33. Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, de Sousa B, et al. Duffy negative antigen is no longer a barrier to Plasmodium vivax--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6):e1192.
34. Poirier P, Doderer-Lang C, Atchade PS, Lemoine JP, de l'Isle MC, Abou-Bacar A, et al. The hide and seek of Plasmodium vivax in West Africa: report from a large-scale study in Beninese asymptomatic subjects. *Malar J.* 2016;15(1):570.
35. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global Epidemiology of Plasmodium vivax. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(6 Suppl):15-34.
36. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(9):555-66.
37. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J.* 2017;16(1):273.
38. Saúde Md, Saúde SdVe. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM. Brasília DF2003. p. 132.
39. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J.* 2016;15(1):284.
40. 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.

41. Alisson F, Barbieri DOSaBSS-F. Population and Land Use Effects on Malaria Prevalence in the Southern Brazilian Amazon. *Human Ecology*. 2005;33(6):28.
42. Neto SAJJAF. Symptomless Plasmodium vivax parasitemias and malaria eradication in Santa Catarina State, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1971;5:15.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Moreira CM, Abo-Shehada M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic Plasmodium vivax infection. *Malaria journal*. 2015;14:360.
47. White NJ, Imwong M. Relapse. *Advances in parasitology*. 2012;80:113-50.
48. White NJ. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. *Malaria journal*. 2011;10:297.
49. 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.
50. de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine-resistant Plasmodium vivax, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(7):1125-6.
51. 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.
52. Saúde Md. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Brasília - DF2010. p. 38.
53. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and Treatment of Plasmodium vivax Malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(6 Suppl):35-51.
54. Orfanó AdS. Abordagens distintas à Interação entre Anopheles spp. e Plasmodium spp: estabelecendo um modelo murino de laboratório, estudando o escape dos esporozoítos e a microbiota 2016.
55. 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.
56. 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.
57. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*. 2006;12(2):220-4.
58. Vanderberg JP. Imaging mosquito transmission of Plasmodium sporozoites into the mammalian host: immunological implications. *Parasitology international*. 2014;63(1):150-64.
59. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(43):18640-5.
60. Voza T, Miller JL, Kappe SH, Sinnis P. Extrahepatic exoerythrocytic forms of rodent malaria parasites at the site of inoculation: clearance after immunization, susceptibility to primaquine, and contribution to blood-stage infection. *Infection and immunity*. 2012;80(6):2158-64.
61. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends in parasitology*. 2015;31(8):357-62.
62. Vaughan AM, Aly AS, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. *Cell host & microbe*. 2008;4(3):209-18.
63. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001;291(5501):141-4.
64. Mota MM, Hafalla JC, Rodriguez A. Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. *Nature medicine*. 2002;8(11):1318-22.
65. Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitology research*. 2011;108(1):247-52.
66. Lindner SE, Miller JL, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cellular microbiology*. 2012;14(3):316-24.
67. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313(5791):1287-90.
68. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006;124(4):755-66.
69. Chen L, Xu Y, Wong W, Thompson JK, Healer J, Goddard-Borger ED, et al. Structural basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies to Plasmodium falciparum protein CyRPA. *Elife*. 2017;6.
70. Josling GA, Llinas M. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. *Nature reviews Microbiology*. 2015;13(9):573-87.
71. Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. *Current opinion in genetics & development*. 2006;16(4):384-91.
72. Alano P. Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Molecular microbiology*. 2007;66(2):291-302.
73. Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cellular microbiology*. 2004;6(7):671-85.
74. Guttery DS, Roques M, Holder AA, Tewari R. Commit and Transmit: Molecular Players in Plasmodium Sexual Development and Zygote Differentiation. *Trends in parasitology*. 2015;31(12):676-85.
75. Baton LA, Ranford-Cartwright LC. How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall? *Trends in parasitology*. 2005;21(1):22-8.
76. Angrisano F, Tan YH, Sturm A, McFadden GI, Baum J. Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut--placing the Plasmodium ookinete centre stage. *International journal for parasitology*. 2012;42(6):519-27.
77. Chan LJ, Dietrich MH, Nguiragool W, Tham WH. Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. *Cellular microbiology*. 2020;22(1):e13110.
78. Lacerda MV, Mourao MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhaes BM, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J*. 2012;11:12.

79. 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. *Int J Parasitol.* 2012;42(12):1099-105.
80. Chu CS, White NJ. Management of relapsing *Plasmodium vivax* malaria. Expert review of anti-infective therapy. 2016;14(10):885-900.
81. 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.
82. Shanks GD, White NJ. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *The Lancet Infectious diseases.* 2013;13(10):900-6.
83. Vallejo AF, Garcia J, Amado-Garavito AB, Arevalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J.* 2016;15:48.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. Milner DA, Jr. *Malaria Pathogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2018;8(1).
88. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in parasitology.* 2012;80:151-201.
89. Adams JH, Mueller I. *The Biology of Plasmodium vivax. Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(9).
90. 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.
91. Olliaro PL, Barnwell JW, Barry A, Mendis K, Mueller I, Reeder JC, et al. Implications of *Plasmodium vivax* Biology for Control, Elimination, and Research. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(6 Suppl):4-14.
92. Feng X, Carlton JM, Joy DA, Mu J, Furuya T, Suh BB, et al. Single-nucleotide polymorphisms and genome diversity in *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8502-7.
93. de Souza-Neiras WC, de Melo LM, Machado RL. The genetic diversity of *Plasmodium vivax*--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(3):245-54.
94. Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends Parasitol.* 2003;19(5):220-6.
95. Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathog Glob Health.* 2015;109(3):142-52.
96. Neafsey DE, Galinsky K, Jiang RH, Young L, Sykes SM, Saif S, et al. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet.* 2012;44(9):1046-50.

97. Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, Hartl DL. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis.* 2007;195(8):1218-26.
98. Orjuela-Sanchez P, Sa JM, Brandi MC, Rodrigues PT, Bastos MS, Amaratunga C, et al. Higher microsatellite diversity in *Plasmodium vivax* than in sympatric *Plasmodium falciparum* populations in Pursat, Western Cambodia. *Exp Parasitol.* 2013;134(3):318-26.
99. Jennison C, Arnott A, Tessier N, Tavul L, Koepfli C, Felger I, et al. *Plasmodium vivax* populations are more genetically diverse and less structured than sympatric *Plasmodium falciparum* populations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(4):e0003634.
100. Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitol Today.* 1996;12(1):20-9.
101. Ferreira MU, Zilversmit M, Wunderlic G. Origins and evolution of antigenic diversity in malaria parasites. *Curr Mol Med.* 2007;7(6):588-602.
102. Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE, Ganguli I, Perera L, Premaratne PH, et al. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol.* 2007;24(4):939-47.
103. Ord RL, Tami A, Sutherland CJ. *ama1* genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. *PLoS One.* 2008;3(10):e3366.
104. Santos-Ciminera PD, Alecrim M, Roberts DR, Quinnan GV, Jr. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in the State of Amazonas, Brazil. *Acta Trop.* 2007;102(1):38-46.
105. Koepfli C, Ross A, Kiniboro B, Smith TA, Zimmerman PA, Siba P, et al. Multiplicity and diversity of *Plasmodium vivax* infections in a highly endemic region in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1424.
106. Havryliuk T, Ferreira MU. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(1):67-73.
107. Srivastava A, Creek DJ, Evans KJ, De Souza D, Schofield L, Muller S, et al. Host reticulocytes provide metabolic reservoirs that can be exploited by malaria parasites. *PLoS Pathog.* 2015;11(6):e1004882.
108. Wilson DJ, Falush D, McVean G. Germs, genomes and genealogies. *Trends Ecol Evol.* 2005;20(1):39-45.
109. Escalante AA, Cornejo OE, Rojas A, Udhayakumar V, Lal AA. Assessing the effect of natural selection in malaria parasites. *Trends Parasitol.* 2004;20(8):388-95.
110. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Iwasaki T, Kanbara H, Hughes AL. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;146(1):105-8.
111. Long CA, Zavala F. Immune Responses in Malaria. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2017;7(8).
112. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med.* 2000;6(6):689-92.
113. Barry AE, Arnott A. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front Immunol.* 2014;5:359.

114. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Batchelor AH, Cummings MP, Escalante AA, et al. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci Transl Med.* 2009;1(2):2ra5.
115. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med.* 1998;4(3):358-60.
116. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28(1-2):51-60.
117. 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. *Adv Parasitol.* 2013;81:77-131.
118. Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar J.* 2012;11:14.
119. Conway DJ. Paths to a malaria vaccine illuminated by parasite genomics. *Trends Genet.* 2015;31(2):97-107.
120. Menard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbao A, et al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(13):5967-71.
121. Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Puijalon O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol.* 2013;81:27-76.
122. Tham WH, Beeson JG, Rayner JC. *Plasmodium vivax* vaccine research - we've only just begun. *Int J Parasitol.* 2017;47(2-3):111-8.
123. Dias S, Wickramarachchi T, Sahabandu I, Escalante AA, Udagama PV. Population genetic structure of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (Pvcsp) in Sri Lanka. *Gene.* 2013;518(2):381-7.
124. Talha AA, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadid ND, Nour BY, Zakeri S. Molecular genetic analysis of *Plasmodium vivax* isolates from Eastern and Central Sudan using pvcsp and pvmsp-3alpha genes as molecular markers. *Infect Genet Evol.* 2015;32:12-22.
125. Mathison BA, Pritt BS. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2009-17.
126. Saúde Md. Malária [Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>].
127. Tadesse FG, van den Hoogen L, Lanke K, Schildkraut J, Tetteh K, Aseffa A, et al. The shape of the iceberg: quantification of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. *Malar J.* 2017;16(1):99.
128. Mouatcho JC, Goldring JPD. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 10):1491-505.
129. Visser T, Daily J, Hotte N, Dolkart C, Cunningham J, Yadav P. Rapid diagnostic tests for malaria. *Bull World Health Organ.* 2015;93(12):862-6.
130. Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Tropical Medicine & International Health.* 2003;8(10):876-83.
131. Rubio J, Buhigas I, Subirats M, Baquero M, Puente S, Benito A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001;39(7):2736-7.

132. McMorrow ML, Aidoo M, Kachur SP. Malaria rapid diagnostic tests in elimination settings—can they find the last parasite? *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(11):1624-31.
133. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(1):66-78.
134. Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain KC. ParaSight® F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997;56(1):44-8.
135. Lima GF, Lucchi NW, Silva-Flannery L, Macedo-de-Oliveira A, Hristov AD, Inoue J, et al. Still Searching for a Suitable Molecular Test to Detect Hidden *Plasmodium* Infection: A Proposal for Blood Donor Screening in Brazil. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150391.
136. Laoboonchai A, Kawamoto F, Thanosingha N, Kojima S, Scott Miller RR, Kain KC, et al. PCR-based ELISA technique for malaria diagnosis of specimens from Thailand. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2001;6(6):458-62.
137. Schindler HC, Montenegro L, Montenegro R, Carvalho AB, Abath FG, Jaureguiberry G. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(4):355-61.
138. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(3):1087-9.
139. Bronner U, Karlsson L, Evengard B. Evaluation of rapid diagnostic tests for malaria in Swedish travellers. *APMIS*. 2011;119(2):88-92.
140. Vandoolaeghe P, Schuerman L. The RTS, S/AS01 malaria vaccine in children 5 to 17 months of age at first vaccination. *Expert review of vaccines*. 2016;15(12):1481-93.
141. Frimpong A, Kusi KA, Ofori MF, Ndifon W. Novel Strategies for Malaria Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(2769).
142. Chaves MM, Costa JM, Zarrouk O, Pinheiro C, Lopes CM, Pereira JS. Controlling stomatal aperture in semi-arid regions-The dilemma of saving water or being cool? *Plant science : an international journal of experimental plant biology*. 2016;251:54-64.
143. 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.
144. Laurens MB. The Promise of a Malaria Vaccine-Are We Closer? *Annu Rev Microbiol*. 2018;72:273-92.
145. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4168-78.
146. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The march toward malaria vaccines. *Vaccine*. 2015;33 Suppl 4:D13-23.
147. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):13-36, Table of Contents.
148. Rodriguez-Barraquer I, Arinaitwe E, Jagannathan P, Kanya MR, Rosenthal PJ, Rek J, et al. Quantification of anti-parasite and anti-disease immunity to malaria as a function of age and exposure. *Elife*. 2018;7.
149. Rodriguez-Barraquer I, Arinaitwe E, Jagannathan P, Boyle MJ, Tappero J, Muhindo M, et al. Quantifying Heterogeneous Malaria Exposure and Clinical Protection in a Cohort of Ugandan Children. *J Infect Dis*. 2016;214(7):1072-80.

150. Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J.* 2012;11:11.
151. Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bull World Health Organ.* 1979;57 Suppl 1:165-73.
152. Clyde DF. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24(3):397-401.
153. Frimpong A, Kusi KA, Ofori MF, Ndifon W. Novel Strategies for Malaria Vaccine Design. *Front Immunol.* 2018;9:2769.
154. Tables of malaria vaccine projects globally [Internet]. 2017 [cited 19/01/2021]. Available from: https://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/.
155. Duffy PE, Patrick Gorres J. Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. *NPJ Vaccines.* 2020;5(1):48.
156. Kebaier C, Voza T, Vanderberg J. Kinetics of mosquito-injected *Plasmodium* sporozoites in mice: fewer sporozoites are injected into sporozoite-immunized mice. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000399.
157. March S, Ng S, Velmurugan S, Galstian A, Shan J, Logan DJ, et al. A microscale human liver platform that supports the hepatic stages of *Plasmodium falciparum* and vivax. *Cell Host Microbe.* 2013;14(1):104-15.
158. Risco-Castillo V, Topcu S, Marinach C, Manzoni G, Bigorgne AE, Briquet S, et al. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell Host Microbe.* 2015;18(5):593-603.
159. Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix): an overview. *Hum Vaccin Immunother.* 2020;16(3):480-9.
160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. Lyke KE. Steady progress toward a malaria vaccine. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(5):463-70.
164. Rts SCTP. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet.* 2015;386(9988):31-45.
165. Rts SCTP. Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med.* 2014;11(7):e1001685.
166. 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.
167. Dattoo MS, Natama MH, Some A, Traore O, Rouamba T, Bellamy D, et al. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2021;397(10287):1809-18.

168. Miura K. Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(6):765-81.
169. Chattopadhyay R, Kumar S. Malaria vaccine: latest update and challenges ahead. *Indian J Exp Biol*. 2009;47(7):527-36.
170. Carvalho LJ, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol*. 2002;56(4):327-43.
171. Zheng J, Pan H, Gu Y, Zuo X, Ran N, Yuan Y, et al. Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. *Biomed Res Int*. 2019;2019:9751471.
172. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. *Am J Prev Med*. 2015;49(6 Suppl 4):S319-33.
173. Coelho CH, Rappuoli R, Hotez PJ, Duffy PE. Transmission-Blocking Vaccines for Malaria: Time to Talk about Vaccine Introduction. *Trends Parasitol*. 2019;35(7):483-6.
174. Mueller I, Taime J, Ibam E, Kundi J, Lagog M, Bockarie M, et al. Complex patterns of malaria epidemiology in the highlands region of Papua New Guinea. *Papua and New Guinea medical journal*. 2002;45(3-4):200-5.
175. 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.
176. 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.
177. 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.
178. Sinnis P, Sim BK. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. *Trends in microbiology*. 1997;5(2):52-8.
179. 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.
180. 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.
181. 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.
182. 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.
183. 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.
184. 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).

185. 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.
186. 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.
187. Moreno A, Joyner C. Malaria vaccine clinical trials: what's on the horizon. *Current opinion in immunology*. 2015;35:98-106.
188. Richard D, MacRaid 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.
189. Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul 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.
190. 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.
191. 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).
192. Tables of malaria vaccine projects globally [Internet]. 2017. Available from: https://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/.
193. 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.
194. 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.
195. 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.
196. 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.
197. 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.
198. 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.
199. Pattaradilokrat S, Trakoolsoontorn C, Simpailipan 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.

200. 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.
201. 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.
202. 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.
203. 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.
204. 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.
205. 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.
206. 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.
207. 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.
208. 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.
209. 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. *Infect Genet Evol*. 2019;73:287-94.
210. 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.
211. 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.
212. 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.
213. 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.

214. 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.
215. Ishino T, Tsuboi T. Progress toward a transmission-blocking vaccine against malaria. *The Lancet Infectious diseases*. 2018;18(9):927-8.
216. 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.
217. 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).
218. 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.
219. 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.
220. 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.
221. 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.
222. Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: who cares? *Malar J*. 2008;7 Suppl 1:S9.
223. Valencia SH, Rodriguez DC, Acero DL, Ocampo V, Arevalo-Herrera M. Platform for *Plasmodium vivax* vaccine discovery and development. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106 Suppl 1:179-92.
224. 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).
225. 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.
226. Chitnis CE, Sharma A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends in parasitology*. 2008;24(1):29-34.
227. 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.
228. Atcheson E, Reyes-Sandoval A. Protective efficacy of peptides from *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Vaccine*. 2020;38(27):4346-54.
229. 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.
230. 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.
231. 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.
232. Geleta G, Ketema T. Severe Malaria Associated with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* among Children in Pawe Hospital, Northwest Ethiopia. *Malar Res Treat*. 2016;2016:1240962.
233. Gupta BK, Gupta A, Nehra HR, Balotia HR, Meena SL, Kumar S. Clinical Profile and Prognostic Indicators in Adults Hospitalized with Severe Malaria Caused by Different *Plasmodium* Species. *Infect Dis (Auckl)*. 2015;8:45-50.
234. Teka H, Petros B, Yamuah L, Tesfaye G, Elhassan I, Muchohi S, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Debre Zeit, Ethiopia. *Malar J*. 2008;7:220.
235. Kristensen KL, Dragsted UB. Recurrent *Plasmodium vivax* malaria due to dose-dependent primaquine resistance: a case report. *Scand J Infect Dis*. 2014;46(1):63-5.
236. Mazumdar S, Mukherjee P, Yazdani SS, Jain SK, Mohmmmed A, Chauhan VS. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1)-MSP-3 chimeric protein: immunogenicity determined with human-compatible adjuvants and induction of protective immune response. *Infect Immun*. 2010;78(2):872-83.
237. Hu J, Chen Z, Gu J, Wan M, Shen Q, Kieny MP, et al. Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, *Plasmodium falciparum* AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. *PLoS One*. 2008;3(4):e1952.
238. Shen FH, Ong JJY, Sun YF, Lei Y, Chu RL, Kassegne K, et al. A Chimeric *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein Antibody Recognizes and Blocks Erythrocytic *P. cynomolgi* Berok Merozoites In Vitro. *Infect Immun*. 2021;89(2).
239. Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol Microbiol*. 2006;59(5):1369-79.
240. Bergmann-Leitner ES, Chaudhury S, Steers NJ, Sabato M, Delvecchio V, Wallqvist AS, et al. Computational and experimental validation of B and T-cell epitopes of the in vivo immune response to a novel malarial antigen. *PloS one*. 2013;8(8):e71610.
241. Bergmann-Leitner ES, Mease RM, De La Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, Ockenhouse C, et al. Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from *Plasmodium falciparum* elicits cross-species protection against heterologous challenge with *Plasmodium berghei*. *PLoS One*. 2010;5(8):e12294.
242. Bergmann-Leitner ES, Legler PM, Savranskaya T, Ockenhouse CF, Angov E. Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CelTOS. *Vaccine*. 2011;29(35):5940-9.
243. Anum D, Kusi KA, Ganeshan H, Hollingdale MR, Ofori MF, Koram KA, et al. Measuring naturally acquired ex vivo IFN-gamma responses to *Plasmodium falciparum* cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) in Ghanaian adults. *Malaria journal*. 2015;14:20.
244. Kusi KA, Bosomprah S, Doodoo D, Kyei-Baafour E, Dickson EK, Mensah D, et al. Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. *Malar J*. 2014;13:103.

245. Bitencourt Chaves L, Perce-da-Silva DS, Rodrigues-da-Silva RN, Martins da Silva JH, Cassiano GC, Machado RL, et al. Plasmodium vivax Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (PvCelTOS) gene sequence and potential epitopes are highly conserved among isolates from different regions of Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005344.
246. 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.
247. Ragotte RJ, Higgins MK, Draper SJ. The RH5-CyRPA-Ripr Complex as a Malaria Vaccine Target. *Trends in Parasitology*. 2020.
248. Knuepfer E, Wright KE, Prajapati SK, 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.
249. Reddy KS, Amlabu E, Pandey AK, Mitra P, Chauhan VS, Gaur D. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for Plasmodium falciparum erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(4):1179-84.
250. 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.
251. 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.
252. Tamborrini M, Hauser J, Schäfer A, Amacker M, Favuzza P, Kyungtak K, et al. Vaccination with virosomally formulated recombinant CyRPA elicits protective antibodies against Plasmodium falciparum parasites in preclinical in vitro and in vivo models. *NPJ vaccines*. 2020;5(1):1-8.
253. Chen L, Xu Y, Wong W, Thompson JK, Healer J, Goddard-Borger ED, et al. Structural basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies to Plasmodium falciparum protein CyRPA. *Elife*. 2017;6:e21347.
254. Singh H, Mian SY, Pandey AK, Krishna S, Anand G, Reddy K, et al. Antibody combinations targeting the essential antigens CyRPA, RH5 and MSP-119 potentially neutralize Plasmodium falciparum clinical isolates from India and Africa. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020.
255. Volz JC, Yap A, Sisqueira 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.
256. 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. *The Journal of Immunology*. 2012;188(12):6225-37.
257. 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. *Cell Microbiol*. 2019;21(7):e13030.
258. 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.

259. González-Cerón L, Cebrián-Carmona J, Mesa-Valle CM, García-Maroto F, Santillán-Valenzuela F, Garrido-Cardenas JA. Plasmodium vivax Cysteine-Rich Protective Antigen Polymorphism at Exon-1 Shows Recombination and Signatures of Balancing Selection. *Genes*. 2021;12(1):29.
260. Bitencourt Chaves L, Guimaraes GO, Perce-da-Silva DS, Banic DM, Totino PRR, Machado RLD, et al. Genetic Diversity of Plasmodium vivax Cysteine-Rich Protective Antigen (PvCyRPA) in Field Isolates from Five Different Areas of the Brazilian Amazon. *Genes (Basel)*. 2021;12(11).
261. Saxena AK, Wu Y, Garboczi DN. Plasmodium p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines. *Eukaryot Cell*. 2007;6(8):1260-5.
262. Sharma B, Jaiswal MK. The P25 Ookinete Surface Proteins: Homology Modeling and Phylogenetic Relationships. *ISRN Computational Biology*. 2013;2013:391018.
263. Tsuboi T, Kaslow DC, Gozar MM, Tachibana M, Cao YM, Torii M. Sequence polymorphism in two novel Plasmodium vivax ookinete surface proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. *Mol Med*. 1998;4(12):772-82.
264. del Carmen Rodriguez M, Gerold P, Dessens J, Kurtenbach K, Schwartz RT, Sinden RE, et al. Characterisation and expression of pbs25, a sexual and sporogonic stage specific protein of Plasmodium berghei. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110(1):147-59.
265. Moreira CK, Marrelli MT, Jacobs-Lorena M. Gene expression in Plasmodium: from gametocytes to sporozoites. *Int J Parasitol*. 2004;34(13-14):1431-40.
266. Saxena AK, Singh K, Su H-P, Klein MM, Stowers AW, Saul AJ, et al. The essential mosquito-stage P25 and P28 proteins from Plasmodium form tile-like triangular prisms. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(1):90-1.
267. Kaslow DC, Quakyi IA, Syin C, Raum MG, Keister DB, Coligan JE, et al. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*. 1988;333(6168):74-6.
268. Appella E, Weber IT, Blasi F. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS letters*. 1988;231(1):1-4.
269. Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, van Lin LH, de Koning-Ward TF, Sinha R, et al. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J*. 2001;20(15):3975-83.
270. Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, Saul A. Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med*. 2000;6(3):241-4.
271. Coban C, Philipp MT, Purcell JE, Keister DB, Okulate M, Martin DS, et al. Induction of Plasmodium falciparum transmission-blocking antibodies in nonhuman primates by a combination of DNA and protein immunizations. *Infection and immunity*. 2004;72(1):253-9.
272. Kaslow DC. Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *International journal for parasitology*. 1997;27(2):183-9.
273. Han YS, Thompson J, Kafatos FC, Barillas-Mury C. Molecular interactions between Anopheles stephensi midgut cells and Plasmodium berghei: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *The EMBO journal*. 2000;19(22):6030-40.
274. Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Y, Miura K, et al. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for Plasmodium vivax malaria. *Vaccine*. 2005;23(24):3131-8.
275. Tsuboi T, Cao Y-M, Hitsumoto Y, Yanagi T, Kanbara H, Torii M. Two antigens on zygotes and ookinetes of Plasmodium yoelii and Plasmodium berghei that are

- distinct targets of transmission-blocking immunity. *Infection and immunity*. 1997;65(6):2260-4.
276. Yoshida S, Matsuoka H, Luo E, Iwai K, Arai M, Sinden RE, et al. A single-chain antibody fragment specific for the *Plasmodium berghei* ookinete protein Pbs21 confers transmission blockade in the mosquito midgut. *Molecular and biochemical parasitology*. 1999;104(2):195-204.
277. Hisaeda H, Stowers AW, Tsuboi T, Collins WE, Sattabongkot JS, Suwanabun N, et al. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect Immun*. 2000;68(12):6618-23.
278. Arevalo-Herrera M, Solarte Y, Yasnot MF, Castellanos A, Rincon A, Saul A, et al. Induction of transmission-blocking immunity in Aotus monkeys by vaccination with a *Plasmodium vivax* clinical grade PVS25 recombinant protein. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(5 Suppl):32-7.
279. Kim TS, Kim HH, Kim JY, Kong Y, Na BK, Lin K, et al. Comparison of the antibody responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* antigens in residents of Mandalay, Myanmar. *Malar J*. 2011;10:228.
280. Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, Fontes E, Malkin EM, Mahanty S, et al. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One*. 2008;3(7):e2636.
281. Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Y, Miura K, et al. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*. 2005;23(24):3131-8.
282. Carter R, Graves PM, Quakyi IA, Good MF. Restricted or absent immune responses in human populations to *Plasmodium falciparum* gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(1):135-47.
283. Miura K, Keister DB, Muratova OV, Sattabongkot J, Long CA, Saul A. Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer. *Malar J*. 2007;6:107.
284. Singh B, Cabrera-Mora M, Jiang J, Moreno A. A hybrid multistage protein vaccine induces protective immunity against murine malaria. *Infect Immun*. 2012;80(4):1491-501.
285. Curtidor H, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Recent advances in the development of a chemically synthesised anti-malarial vaccine. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(11):1567-81.
286. Ferreira MU, da Silva Nunes M, Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(6):987-95.
287. Souza PF, Xavier DR, Suarez Mutis MC, da Mota JC, Peiter PC, de Matos VP, et al. Spatial spread of malaria and economic frontier expansion in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2019;14(6):e0217615.
288. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3):585-95.
289. Renia L, Goh YS. Malaria Parasites: The Great Escape. *Front Immunol*. 2016;7:463.
290. Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Acuna Hidalgo B, Durand P, Houze S, et al. Human *Plasmodium vivax* diversity, population structure and evolutionary origin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(3):e0008072.
291. de Oliveira TC, Corder RM, Early A, Rodrigues PT, Ladeia-Andrade S, Alves JMP, et al. Population genomics reveals the expansion of highly inbred *Plasmodium*

- vivax lineages in the main malaria hotspot of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(10):e0008808.
292. Han ET, Lee WJ, Sattabongkot J, Jang JW, Nam MH, An SS, et al. Sequence polymorphisms of *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins (Pvs25 and Pvs28) from clinical isolates in Korea. *Trop Med Int Health*. 2010;15(9):1072-6.
293. Gonzalez-Ceron L, Alvarado-Delgado A, Martinez-Barnetche J, Rodriguez MH, Ovilla-Munoz M, Perez F, et al. Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from Southern Mexico and their association to local anophelines infectivity. *Infect Genet Evol*. 2010;10(5):645-54.
294. Escalante AA, Cornejo OE, Freeland DE, Poe AC, Durrego E, Collins WE, et al. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(6):1980-5.
295. Zakeri S, Razavi S, Djadid ND. Genetic diversity of transmission blocking vaccine candidate (Pvs25 and Pvs28) antigen in *Plasmodium vivax* clinical isolates from Iran. *Acta Trop*. 2009;109(3):176-80.
296. Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Machado RL, Fairhurst RM, et al. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. *Mol Biol Evol*. 2013;30(9):2050-64.
297. Cornejo OE, Escalante AA. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*. 2006;22(12):558-63.
298. Culleton R, Coban C, Zeyrek FY, Cravo P, Kaneko A, Randrianarivelojosia M, et al. The origins of African *Plasmodium vivax*; insights from mitochondrial genome sequencing. *PLoS One*. 2011;6(12):e29137.
299. Chaurio RA, Pacheco MA, Cornejo OE, Durrego E, Stanley CE, Jr., Castillo AI, et al. Evolution of the Transmission-Blocking Vaccine Candidates Pvs28 and Pvs25 in *Plasmodium vivax*: Geographic Differentiation and Evidence of Positive Selection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):e0004786.
300. Feng H, Zheng L, Zhu X, Wang G, Pan Y, Li Y, et al. Genetic diversity of transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 in *Plasmodium vivax* isolates from Yunnan Province, China. *Parasit Vectors*. 2011;4:224.
301. Saxena AK, Singh K, Su HP, Klein MM, Stowers AW, Saul AJ, et al. The essential mosquito-stage P25 and P28 proteins from *Plasmodium* form tile-like triangular prisms. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(1):90-1.
302. Barry AE, Schultz L, Buckee CO, Reeder JC. Contrasting population structures of the genes encoding ten leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2009;4(12):e8497.
303. Kaslow DC, Quakyi IA, Keister DB. Minimal variation in a vaccine candidate from the sexual stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;32(1):101-3.
304. Shi YP, Alpers MP, Pova MM, Lal AA. Single amino acid variation in the ookinete vaccine antigen from field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;50(1):179-80.
305. Takala SL, Plowe CV. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. *Parasite Immunol*. 2009;31(9):560-73.

9 ANEXOS

9.1 Anexo I – Artigo PvCeITOS (1º autora)

RESEARCH ARTICLE

Plasmodium vivax Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (PvCelTOS) gene sequence and potential epitopes are highly conserved among isolates from different regions of Brazilian Amazon

Lana Bitencourt Chaves¹, Daiana de Souza Perce-da-Silva², Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva¹, João Herminio Martins da Silva³, Gustavo Capatti Cassiano⁴, Ricardo Luiz Dantas Machado⁵, Lillian Rose Pratt-Riccio⁶, Dalma Maria Banic², Josué da Costa Lima-Junior^{1*}

1 Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratory of Clinical Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Computational Modeling Group - FIOCRUZ - CE, Fortaleza, Brazil, **4** Laboratory of Tropical Diseases - Prof. Luiz Jacintho da Silva, Department of Genetics, Evolution and Bioagents, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, **5** Malaria Immunogenetic Laboratory, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brazil, **6** Laboratory of Malaria Research, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* josue@ioc.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Bitencourt Chaves L, Perce-da-Silva DdS, Rodrigues-da-Silva RN, Martins da Silva JH, Cassiano GC, Machado RLD, et al. (2017) *Plasmodium vivax* Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (PvCelTOS) gene sequence and potential epitopes are highly conserved among isolates from different regions of Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005344. doi:10.1371/journal.pntd.0005344

Editor: Nicholas P. Day, Mahidol University, THAILAND

Received: August 23, 2016

Accepted: January 21, 2017

Published: February 3, 2017

Copyright: © 2017 Bitencourt Chaves et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Brazilian National Research Council—CNPq/PAPES, (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Programa de Apoio e Pesquisa Estratégica em Saúde) Fiocruz. JdCLJ is recipient

Abstract

The *Plasmodium vivax* Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (PvCelTOS) plays an important role in the traversal of host cells. Although essential to PvCelTOS progress as a vaccine candidate, its genetic diversity remains uncharted. Therefore, we investigated the PvCelTOS genetic polymorphism in 119 field isolates from five different regions of Brazilian Amazon (Manaus, Novo Repartimento, Porto Velho, Plácido de Castro and Oiapoque). Moreover, we also evaluated the potential impact of non-synonymous mutations found in the predicted structure and epitopes of PvCelTOS. The field isolates showed high similarity (99.3% of bp) with the reference Sal-1 strain, presenting only four Single-Nucleotide Polymorphisms (SNP) at positions 24A, 28A, 109A and 352C. The frequency of synonymous C109A (82%) was higher than all others ($p < 0.0001$). However, the non-synonymous G28A and G352C were observed in 9.2% and 11.7% isolates. The great majority of the isolates (79.8%) revealed complete amino acid sequence homology with Sal-1, 10.9% presented complete homology with Brazil I and two undescribed PvCelTOS sequences were observed in 9.2% field isolates. Concerning the prediction analysis, the N-terminal substitution (Gly10Ser) was predicted to be within a B-cell epitope (PvCelTOS Accession Nos. AB194053.1) and exposed at the protein surface, while the Val118Leu substitution was not a predicted epitope. Therefore, our data suggest that although G28A SNP might interfere in potential B-cell epitopes at PvCelTOS N-terminal region the gene sequence is highly conserved among the isolates from different geographic regions, which

of a FAPERJ APO1 (E-26/210.653/2015), Jovem Cientista do Nosso Estado (E26/203.255/2016). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

is an important feature to be taken into account when evaluating its potential as a vaccine candidate.

Author summary

Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) presents a pivotal role in the cell traversal of host cells in mosquito and vertebrate hosts. For this reason, it has been considered a potential novel alternative for a vaccine against malaria caused by *P. falciparum*. However, little is known about its orthologous *P. vivax* CelTOS. Although the genetic diversity of this protein could be a limiting factor for acquisition of immunity and present implications for an effective vaccine development, it has never been explored. Thus, considering that the epidemiology of malaria in Brazil presents variable transmission rates and the knowledge on the genetic polymorphism of PvCelTOS remains unknown, we aimed to identify the *pvceltos* gene in isolates from five different regions of the Brazilian Amazon and to study the potential impacts of the genetic diversity of PvCelTOS in protein structures and predicted epitopes. Our findings indicate that PvCelTOS is an extremely conserved protein, presenting only four SNPs in the entire sequences of field isolates from Brazilian Amazon. The two non-synonymous mutations found in our field isolates presented no significant effect on the protein structure and a very low impact on potential T and B-cell epitopes indicated by our epitope prediction. Collectively, our data suggest that the small need to avoid the immune recognition by the human host and its importance on the parasite's survival and transmission reflects a very conservative profile of *pvceltos* gene in field samples from Brazil and other endemic areas worldwide.

Introduction

Malaria is an infectious parasitic disease with high prevalence and morbidity. Globally, it is estimated that 3.2 billion people in 95 countries and territories are at risk of being infected and develop the disease. In 2015, malaria caused an estimate of 438,000 deaths, mostly in African children [1]. Among the protozoa species causative of human malaria, *Plasmodium vivax*, although less prevalent than *P. falciparum* in absolute numbers, presents the world's largest spread, an increasing morbidity [2] and became the main cause of malaria outside Africa. In Brazil, although there are three species of *Plasmodium* that cause malaria (*P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae*), approximately 87% of the 142,000 cases reported in 2015 were caused by *P. vivax* [3]. Thus, it is extremely important to develop new methods and intervention strategies to block or reduce this transmission.

Significant effort and progress on *P. vivax* control have occurred over the last years, but the understanding of *P. vivax* biology is still crucial to develop potential vaccines and to achieve the goal of eliminating malaria. The ability of the *Plasmodium* to recognize, and then invade hepatocytes or red blood cells, is central to the life cycle and also to the disease process. During the pre-erythrocytic stage, it is well established that *Plasmodium* sporozoites migrate through Kupffer cells and several hepatocytes before finally infecting a hepatocyte. Therefore, antigens located on the surface of the parasite or specifically in apical organelles of the parasite during this stage have been suggested as a target for a better understanding of *Plasmodium* lifecycle and, consequently possibly used as vaccine [4]. In this context, the Cell-Traversal protein for Ookinetes and Sporozoites (CelTOS) has been considered a new alternative for vaccine

development [5,6]. This protein, secreted by micronemes, is important to the success of cell crossing by sporozoites and ookinetes, and also hepatocyte invasion carried out by sporozoites. Studies have shown that the disruption of the CelTOS gene encoding, in *P. berghei*, reduces the infectivity in the mosquito host and also the infectivity of the sporozoite in the liver, almost eliminating their ability to cell pass [7]. In addition, the CelTOS is necessary for the motility of the parasite in both the mosquito vector and the human host, being determinant for the success of malaria infections [8]. Recently, studies from Jimah et al. suggested that the CelTOS is responsible for breaking the cell membranes from the inside of infected human and mosquito cells to enable the parasites to exit and complete the traversal process (Jimah et al 2016). In relation to its potential as a vaccine candidate, antibodies against PfCelTOS were able to inhibit sporozoite traversal of hepatocytes [9], and induce protection in animals [10]. In humans, PfCelTOS derivative peptides elicited proliferative and IFN- γ responses in *ex vivo* ELISPOT assays using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from irradiated sporozoite-immunized volunteers [8] and recombinant PfCelTOS were recognized by naturally acquired antibodies from exposed populations living in highly endemic areas from Africa [11]. However, all those previous studies used CelTOS protein of *P. falciparum* and/or *P. berghei*. Despite the antigenic and immunogenic properties of PfCelTOS, there is only one recent finding concerning the antigenic potential of its counterpart in *P. vivax*, the PvCelTOS, whose naturally acquired antibodies were able to recognize the recombinant protein [12].

Although essential to the development of its potential as a vaccine candidate, there is no available published data on the identification of *pvceltos* gene in field isolates and the evaluation of its genetic diversity in endemic areas. In fact, the extensive genetic diversity in natural parasite populations is a major obstacle for the development of an effective vaccine against the human malaria parasite, since antigenic diversity limits the efficacy of acquired protective immunity to malaria [13]. Despite the genetic diversity, which is one of the most prominent features of *P. vivax* infections, there is also a paucity of information on *celtos* gene polymorphism. Such data have importance in documenting the parasite genetic diversity changes and contribute to malaria control interventions in the future. Therefore, we proposed to identify *pvceltos* gene isolates from different regions of Brazilian Amazon and to study the potential impacts of the genetic diversity of PvCelTOS in protein structures and potential epitopes through bioinformatics tools.

Methods

Study sites and blood sample collection

Most cases of malaria in Brazil are concentrated in the Amazon Region, an endemic area for the disease [14]. Therefore, the study was carried out in five different regions of Brazilian Amazon (Fig 1). A subset of 81 patients was analyzed out of 312 individuals previously evaluated by Cavasini et al (2007) [15] (21 individuals from Plácido de Castro, 9 individuals from Oiapoque, 25 individuals from Novo Repartimento and 26 individuals from Porto Velho) and, additionally, blood samples were collected from 38 *P. vivax* infected individuals from Manaus. Thus, a total of 119 blood samples were used in this study.

Plácido de Castro (PLC), is a city 90 km far from the capital of the State of Acre, located in Western Brazilian Amazon, with a population of 17,334 thousand inhabitants (16% aged above 18 years, at 153 meters above sea level, with a territorial area of 2,047,000 km², latitude of -09° 58' 29" and longitude of 67° 48' 36", where the main economic activities are cattle breeding, rubber agriculture and farming. Active malaria transmission takes place during all periods of the year.

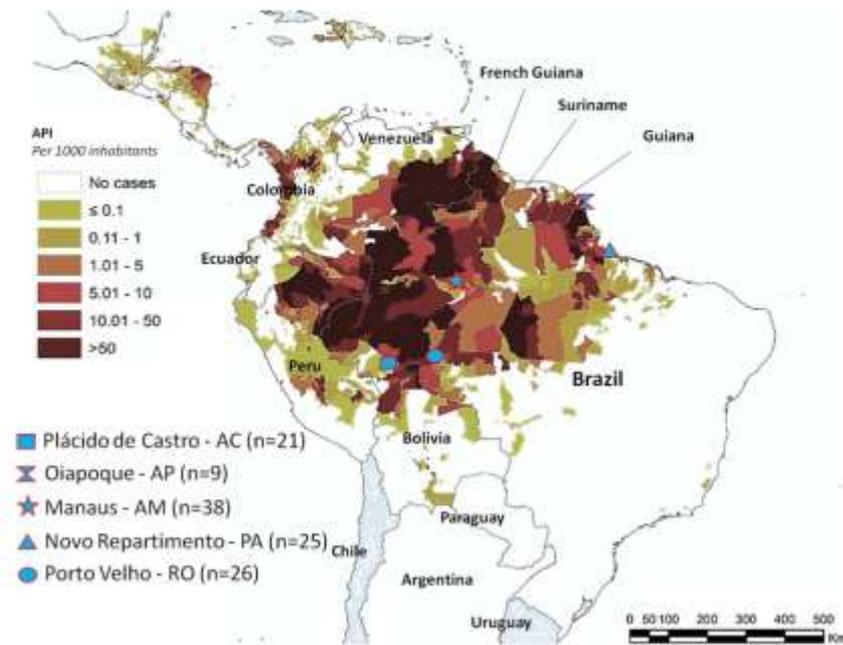


Fig 1. Geographical map showing the five study sites and the respective Annual Parasitic Incidence (API) (SIVEP-Malaria).

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g001

Oiapoque (OIP), Amapá State, located in the Brazilian Eastern Amazon, a mining gold area, with 17,423 a thousand inhabitants, presenting latitude of 03° 49' 58" and longitude of 51° 49' 51".

Manaus (MAO), the capital of Amazonas State, located in the Northern Region of Brazil, with a population of more than 2 million people. It is the most populous city of Amazonas state, presenting latitude of -03° 06' 07" and longitude of -60° 01' 3".

Novo Repartimento (NR), is a city 600 km far from Belém, capital of the State of Pará, located in Brazilian Eastern Amazon, with 47,197 thousand inhabitants, at 460 meters above sea level, with a territorial area of 11,407 km², presenting latitude of 04° 19' 5" and longitude of 49° 47' 47", whose main economic activities are cattle breeding, commerce of manufactured products and farming. It presents active malaria transmission from January to December, with around 2,000 heterochthonous and autochthonous cases.

Porto Velho (PVL), capital of the Rondônia State, located in Western Brazilian Amazon, with a population of 360,068 thousand inhabitants (16% aged above 18 years), at 85 meters above sea level, with a territorial area of 34,082 km², latitude of -08° 45' 43" and longitude of 63° 45' 43", where the main economic activities are cattle breeding, rubber agriculture, wood exploration and farming. Active malaria transmission takes place during all periods of the year. The distances between the study sites are shown in Table 1.

Table 1. Distance in km between the five study sites.

Locality	Distance (km)			
	OIP	MAO	NR	PVL
OIP	-	-	-	-
MAO	1,196	-	-	-
NR	938	1,143	-	-
PVL	1,939	760	1,835	-
PLC	2,313	1,119	2,024	393

OIP: Oiapoque, AP; MAO: Manaus, AM; NR: Novo Repartimento, PA; PVL: Porto Velho, RO; PLC: Plácido de Castro, AC.

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t001

All *P. vivax* participants were enrolled according to the following criteria: sought medical assistance for clinical malaria symptoms, presented uncomplicated malaria symptoms, were > 18 years of age, and had a positive *P. vivax* malaria diagnosis. Pregnant women, patients < 18 years of age, and *P. vivax*- and *P. falciparum*-infected individuals were excluded from the study. Thin and thick blood smears were examined for the identification of the malaria parasite by a technician experienced in malaria diagnosis from the Brazilian Malaria Health Services. Thick blood smears from all of the subjects were stained with Giemsa, and a total of 200 microscopic fields were examined under a 1,000-fold magnification. Thin blood smears of the positive samples were examined for species identification. To increase the sensitivity of parasite detection, molecular analyses using specific primers for genus (*Plasmodium* sp) and species (*P. falciparum* and *P. vivax*) were performed in all of the samples as previously described. Donors positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated by the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

Ethical considerations

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of each locality, which included obtaining the following patients' written consents for research use of their blood samples: Belém (Novo Repartimento/PA): 68473–970; Porto Velho (CEPEN): 76812–329; Rio Branco (Hospital Geral de Plácido de Castro/AC): 69928–000; Oiapoque (Hospital Municipal do Oiapoque/AP): 68980–000; Manaus (CEP-FIOCRUZ): 346–613. Written informed consents were obtained from all adult donors or from the parents of donors in the case of children. All the procedures adopted in this study fully complied with specific federal permits issued by the Brazilian Ministry of Health.

Genomic DNA extraction

The DNA was extracted from blood samples using the QIAamp DNA blood midi kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions and stored at -20°C until amplification.

Design of PvCelTOS specific primers

The *pvceltos* gene is conserved among different species of *Plasmodium* and to obtain that of *P. vivax*, specific primers were designed using standard gene sequences of *P. vivax* Salvador-1 strain from NCBI database with Accession Nos. AB194053.1. All oligonucleotides were checked for specificity by using the Primer-BLAST tool provided by the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The forward

primer (5'-CCCCAAAGGCAAATGAACAA-3') corresponded position 20 to 41 of the *pvceltos* gene sequence and the reverse primer (5'-AACTCATCTTCAGCTTCTTCCTC-3') corresponded to position 569 to 547. The specific primers were chemically synthesized to perform PCR reaction and DNA sequencing.

PCR amplification of *pvceltos* gene

The *pvceltos* gene was amplified in a conventional PCR method using the pair of primers PvCelTOS 5'-CCCCAAAGGCAAATGAACAA-3' (forward) and PvCelTOS 5'-AACTCATCTTCAGCTTCTTCCTC-3' (reverse). Amplification of the *pvceltos* gene was conducted in a reaction volume of 25 μ L using 1 μ L of DNA, 10 pmol/ μ L of each primer and the Master Mix kit (Promega) containing Taq DNA polymerase, PCR buffer and 10 nmol of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP, Promega, Madison, WI USA). The conventional PCR reactions were carried out using a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem) and the cycling conditions were as follows: one step at 95°C for 2 min.; 30 cycles at 95°C for 1 min., 57°C for 1 min. and 72°C for 1 min.; and a last step at 72°C for 1 min. In all reactions two negative controls were used (one without DNA and other with DNA extracted from *in vitro* culture of *P. falciparum* PSS1 strain) and a positive control (*P. vivax*-infected sample). To confirm the presence of DNA from the *in vitro* culture of *P. falciparum* and that the lack of amplification was due the specificity of the primers for PvCelTOS, we performed the amplification of the *P. falciparum* P126 gene fragment and electrophoresis as previously described [16]. Moreover, three *P. vivax*-infected samples from our study sites were randomly chosen. Five μ L of PCR product were submitted to electrophoresis in 2% agarose gel (Sigma) in 1x TAE buffer (0.04 M TRIS-acetate, 1 mM EDTA) in the presence of 10x GelRed nucleic acid stain (Biotium) and afterwards the products were visualized by ultraviolet (UV) illumination. Sizing of products was performed using a GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Then, PCR fragments were purified using the GE Healthcare Lifesciences kit according to the manufacturer's protocol and sequenced.

DNA sequencing and polymorphism analysis

The specificity of the assay was confirmed by sequencing the PCR products from all positive samples using a Big Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The DNA sequencing was carried out on the 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) and the results were analyzed using DNASTAR's sequence alignment software to identify polymorphism relative to the Sal-1 reference sequence from NCBI.

3D model and electrostatic analysis of PvCelTOS

The 3D structure of PvCelTOS was predicted using the Robetta algorithm [17]. The amino acid sequence was retrieved from NCBI under Accession Nos. AB194053.1. The Robetta is an automated algorithm for predictions of the 3D structure of proteins through *ab initio* and comparative modeling. The first step is the search for structural homologs using BLAST [18] or PSI-BLAST [19]. In the protein sequence, the target primary structure is broken down into separated domains, or independently folding units of proteins, by comparing the sequence to structural families in the Pfam database [20]. Domains with homolog structures follow a template-based modeling protocol. The final five structures are selected by taking the lowest energy models as determined by the Rosetta energy function. The electrostatic surface was calculated with the Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) software [21] integrated with Pymol. The APBS software solves the Poisson-Boltzmann equation in order to describe

electrostatic interactions between solute in aqueous solution. Continuous electrostatics plays a very important role in determining ligand-protein and protein-protein binding kinetics.

Prediction of linear B-cell and T-cell epitopes

The prediction of linear B-cell epitopes was carried out using the program BepiPred [22]. This software takes a single sequence in FASTA format input and each amino acid receives a prediction score based on Hidden Markov Model profiles of known antigens and incorporates propensity scale methods based on hydrophilicity and secondary structure prediction. For each input sequence the server outputs a prediction score. The positions of the linear B-cell epitopes are predicted to be located at the residues with the highest scores. In order to consider a given region as a valid linear B-cell epitope for PvCelTOS, the cut-off value of 0.35 was used to warrant similar values of specificity (0.75) and sensitivity (0.49). Therefore, the epitope score represents the average of the scores of at least eight consecutive amino acids above the cut-off, and the sequences with higher mean values were chosen as potential linear epitopes.

The differential binding of T-cell epitopes spanning the full PvCelTOS sequence were made on 4/18/2016 using the IEDB analysis resource Consensus tool [23] which combines predictions from ANN aka NetMHC (3.4) [24,25], SMM [26] and Comlib [27]. Considering lengths of 9 mers, the prediction score of each length was evaluated against 26 of the most frequent HLA alleles (HLA-A*01:01; HLA-A*02:01; HLA-A*11:01; HLA-A*23:01; HLA-A*25:01; HLA-A*26:01; HLA-A*30:01; HLA-A*31:01; HLA-A*32:01; HLA-A*68:01; HLA-B*08:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*35:01; HLA-B*38:01; HLA-B*39:01; HLA-B*40:01; HLA-B*46:01; HLA-B*48:01; HLA-B*51:01; HLA-B*53:01; HLA-B*57:01; HLA-B*58:01; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*07:01). Peptides with median consensus percentile rank 20.0 as predicted binders and at least 60% of HLA binding frequency was considered potential T-cell epitopes.

Statistical analysis

The one-sample Kolmogorov-Smirnoff test was used to determine whether a variable was normally distributed. Differences in proportions of haplotypes frequencies between studied localities were evaluated by the Fisher's exact test using Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.). A two-sided P value < 0.05 was considered significant. Sequences were aligned using CLUSTAL X2 and the number of segregation sites (S), number of haplotypes, nucleotide diversity (π) and haplotype diversity were computed using DnaSP v5 [28]. The Tajima's D test [29] for determining departure from the predictions of the neutral theory of evolution was also estimated with DnaSP v5. The genetic differentiation between populations was investigated evaluating the rate of fixation (F_{ST}) by analysis of molecular variance (AMOVA) implemented in ARLEQUIN v3.5.2.2 [30] and significances were estimated using 10,000 permutations. The significance level was adjusted by Bonferroni correction for multiple tests.

Results

Standardization and molecular characterization of PvCelTOS in the studied regions

In order to identify the gene encoding the PvCelTOS in isolates from Brazilian endemic areas, 119 blood samples from infected individuals living in the cities of Porto Velho, Plácido de Castro, Manaus, Novo Repartimento and Oiapoque had the DNA extracted and subjected to molecular diagnosis by PCR. The primers designed from the Primer-BLAST program and PCR analysis by agarose gel revealed the amplification in 100% samples. All field isolates

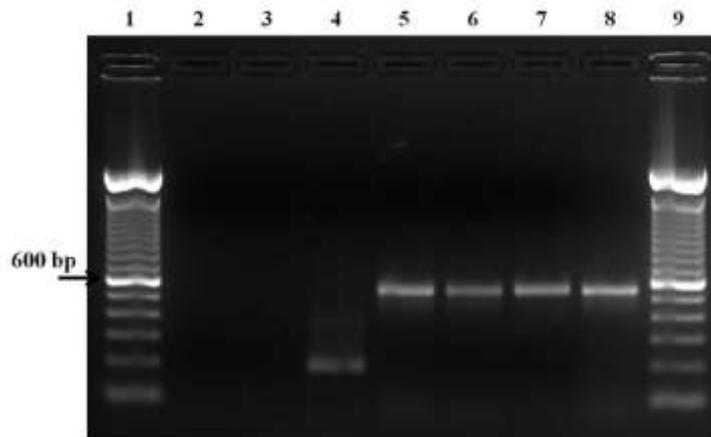


Fig 2. PCR amplification of the *pvceltos* gene. Fig 2 shows in Lane 1: 100 bp Molecular Marker; Lane 2: Negative control (water); Lane 3: *In vitro* culture of *P. falciparum* (amplification with PvCelTOS primers); Lane 4: *In vitro* culture of *P. falciparum* (amplification with p126 primers); Lane 5: PCR positive control (*P. vivax*-infected sample); Lanes 6, 7 and 8: samples; Lane 9: 100 bp Molecular Marker.

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g002

presented only one type of fragment corresponding to 550 base pair (bp). In addition to these samples, *P. falciparum* specimens were also tested, but proved negative for PCR amplification of the *pvceltos* gene (Fig 2). Therefore, the 119 samples from individuals infected with *P. vivax* amplified by PCR were subjected to sequencing reactions in order to screen the possible single nucleotide polymorphisms of the gene encoding the PvCelTOS.

Pvceltos gene is highly conserved among field isolates, but presents few synonymous and non-synonymous mutations at specific positions

Standard gene sequences of *P. vivax* Salvador-1 (Sal-1) encoding PvCelTOS were aligned to sequences from different regions of Brazilian Amazon isolates. Identification of variants and novel haplotypes was done and our interpretations were confirmed with available standard gene sequence of the *P. vivax* CelTOS in PubMed database. The polymorphism identification in the gene encoding the PvCelTOS from our studied regions revealed that all isolates had a high degree of similarity in relation to base pair alignments with the reference strain (99.3%). However, from the 550 bp sequenced and aligned, four nucleotide bases (0.7%) presented mutations in specific bp positions (24, 28, 109 and 352), shown in Table 2. Interestingly, we did not detect point mutations in a single field or geographic area and all SNPs were present in at least two isolates and two sampling localities. Even with the high conservation degree of *pvceltos* gene sequence, 85% of the studied isolates presented at least one SNP in relation to the reference strain. As shown in Fig 3a, the synonymous mutation C109A was present in 82% field isolates and was significantly higher than all other 3 mutations ($p < 0.0001$), while the other synonymous mutation C24A was the least frequent mutation. Two non-synonymous mutations, G28A and G352C, which represent the substitution of Glycine for Serine and Valine for Leucine, respectively, were also detected in frequencies of 9.2% and 11.7%, respectively. In addition, regarding the endemic areas studied, the higher frequency of C109A was

Table 2. Mutations and corresponding amino acid substitutions in *pvceltos* gene.

Sequences	Nucleotide position			
	22 to 24	28 to 30	109 to 111	352 to 354
Wild Type	CCC	GGC	CGG	GTG
Mutants	--A	A--	A--	C--
	Amino acid position			
	8	10	37	118
Wild Type	Pro	Gly	Arg	Val
Mutants	-	Ser	-	Leu

Nucleotide and amino acid positions

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t002

maintained in all localities. Manaus presented the highest diversity, since we detected all four mutations among the 38 samples, while Porto Velho presented the lowest diversity, with only the synonymous mutation C109A. Lastly, in field isolates from Plácido de Castro, the non-synonymous SNP G352C was also significantly higher than C24A ($p = 0.0086$) and G28A ($p = 0.0480$), while in all other localities this predominance did not occur (Fig 3b).

PvCelTOS haplotype frequency in field isolates

Only 18 isolates (15%) maintained their sequences identical to the reference strain in positions 24, 28, 109 and 352 (H1 = CGCG). Furthermore, the mutations resulted in nine different haplotypes (H2 = AGCG; H3 = CACG; H4 = CGAG; H5 = CAAG; H6 = CGAC; H7 = AGAG; H8 = CAAC; H9 = AAAG), whose frequencies are shown in Table 3. Among all field isolates studied the haplotype H4 presented the highest frequency and was significantly higher when compared to the reference H1 ($p < 0.0001$). On the other hand H2 ($p < 0.0001$), H3 ($p = 0.0002$), H5 ($p = 0.0328$), H7 ($p = 0.0028$), H8 ($p < 0.0001$) and H9 ($p < 0.0001$) presented significantly lower frequencies when compared to H1. However, regarding these haplotypes obtained from human isolates from the Amazon regions, we could not determine a genetic

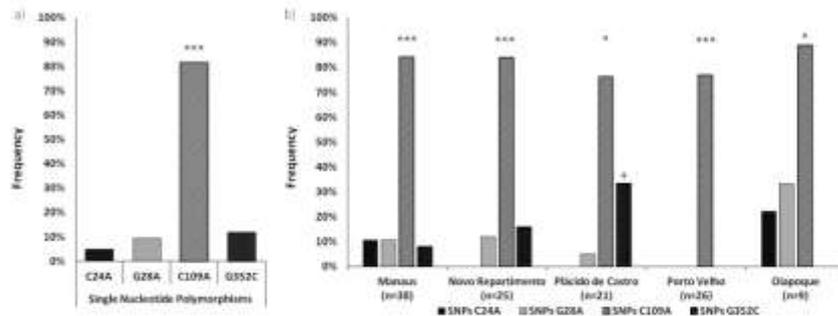


Fig 3. Analysis of genetic diversity of *PvCelTOS* in *Plasmodium vivax* isolates. (A) Fig A represents four mutations in specific bp positions (24, 28, 109 and 352). (B) The graphic represents the frequency of mutations in isolates from each studied locality. The black bar indicates the synonymous mutation C24A; the gray bar, the non-synonymous mutations G28A; the striped bar, the synonymous mutation C109A and the white dotted bar represents the non-synonymous G352C. (*) Indicates that the differences between the frequency of SNP C109A was higher than that of other mutations by exact test and (+) indicates that the frequency of SNP G352C was higher than the frequency of SNPs C24A and G28A by Fisher's. (*): $p < 0.05$; (**): $p < 0.01$; (***) $p < 0.0001$.

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g003

Table 3. Distribution of PvCelTOS haplotypes among five studied localities of Brazilian Amazon.

Locality	Haplotypes PvCelTOS—n (%) (Nucleotide positions 24, 28, 109 and 352—CGCG)								
	Ref. strain—H1 (CGCG)	H2 (AGCG)	H3 (CACG)	H4 (CGAG)	H5 (CAAG)	H6 (CGAC)	H7 (AGAG)	H8 (CAAC)	H9 (AAAG)
Manaus (n = 38)	5 (13.1%)	1 (2.6%)	-	22 (57.8%) ***	4 (10.5%)	3 (7.8%)	3 (7.8%)	-	-
Novo Repartimento (n = 25)	3 (12%)	-	1 (4%)	16 (64%) ***	1 (4%)	3 (12%)	-	1 (4%)	-
Plácido de Castro (n = 21)	3 (14.3%)	-	1 (4.8%)	10 (47.6%)*	-	7 (33.3%)	-	-	-
Porto Velho (n = 26)	6 (23.1%)	-	-	20 (76.9%) ***	-	-	-	-	-
Oiapoque (n = 9)	1 (11.1%)	-	-	4 (44.4%)	2 (22.2%)	-	1 (11.1%)	-	1 (11.1%)
Total (n = 119)	18 (15.1%)	1 (0.8%)***	2 (1.7%)***	72 (60.5%)***	7 (5.9%)*	13 (10.9%)	4 (3.4%)**	1 (0.8%)***	1 (0.8%)***

The values represent the number and frequency (%) of found haplotypes on each studied locality. H4 represents the consensus sequence. (*) Indicates that the difference between the frequencies of mutate haplotype and reference strain (H1) was significant by Fisher's exact test.

(*): $p < 0.05$;

(**): $p < 0.01$;

(***): $p < 0.0001$.

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t003

structure based on the localities. Therefore, we observed that H1 and H4 were present in all studied localities while H2, H8 and H9 were detected in only a single locality (Manaus, Novo Repartimento and Oiapoque respectively). Even though the haplotypes could not be segregated according to their geographic origin, Manaus and Novo Repartimento presented the highest diversity of field isolates with six different haplotypes, while Porto Velho presented the lowest diversity, with only two haplotypes, which were common to all localities (H1 and H4). Interestingly, despite the difference in number of field isolates, Oiapoque presented a high diversity of *pvceltos* gene sequence with five haplotypes while only four different haplotypes were detected in Plácido de Castro (Table 3). Due to the very high similarity among sequences from different geographic origins and the consequent lack of phylogenetic signal, it was not possible to analyze the haplotypes in reliable clades.

Population genetic analysis

We sequenced *pvceltos* gene (positions 19–569) of 119 samples collected from five regions of Brazilian Amazon. From the alignment with reference strain (Sal-1), four distinct SNPs were identified. Two SNPs were synonymous (C24A and 109A) and two were non-synonymous (G28A and G352C). The nucleotide diversity (π) for *pvceltos* of 119 sequences analyzed was 0.00141 ± 0.00014 . The highest nucleotide diversity was observed in the Oiapoque group (0.00202 ± 0.00044), followed by the Plácido de Castro group (0.00161 ± 0.00029). Among all 5 populations, Porto Velho sequences displayed the lowest nucleotide diversity (0.00067 ± 0.00017) as expected, since only one SNP was detected in this group (Table 4). Similarly, parasites from Oiapoque presented the highest estimate of haplotype diversity (H_d) (0.806 ± 0.014) whereas parasites from Porto Velho showed the lowest H_d (0.369 ± 0.091). Haplotype diversity was similar among the other studied areas (Table 4). The Tajima's D test was performed to assess if there is selective pressure on the *pvceltos* gene. Although the Tajima's D values ranged between -0.279 and 0.699, tests showed no significant departures from neutrality in all studied areas, indicating no significant selection in the *pvceltos* gene (Table 4).

Pairwise comparisons between each parasite population were performed using the F_{ST} statistics to check whether there was indicative of genetic differentiation between parasite

Table 4. Comparison of genetic diversity among isolates from Brazil.

	No. of segregating sites (S)	No. of haplotypes	Haplotype diversity (H_d)	Nucleotide diversity (π)	Tajima's test
Novo Repartimento	3	6	0.58	0.00142	-0.045 ^{ns}
Manaus	4	6	0.66	0.00153	-0.279 ^{ns}
Oiapoque	3	5	0.81	0.00202	0.025 ^{ns}
Porto Velho	1	2	0.37	0.00067	0.699 ^{ns}
Plácido de Castro	3	4	0.67	0.00161	0.163 ^{ns}
All samples	4	9	0.61	0.00141	0.077 ^{ns}

The extent of *pvceltos* gene sequence corresponds to nucleotides 19–569 (reference clone Sal-1).
^{ns}; not significant ($p > 0.10$).

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t004

populations, but all F_{ST} values were non-significant, suggesting lack of genetic differentiation between the studied populations (Table 5).

Non-synonymous mutations reveal low diversity of PvCelTOS protein sequence in relation to genome sequences available worldwide

The detected non-synonymous mutations characterized the specific amino acid substitutions in positions 10 (Glycine for Serine) and 118 (Valine for Leucine). As observed in the protein sequence alignments, PvCelTOS also presented high amino acid sequence conservation degree, since only 24 isolates (19.2%) presented non-synonymous mutations and had different sequences in comparison with the reference Sal-1 strain, whose frequency was significantly higher than all other protein sequences found in our field isolates (79.8%; $p < 0.0001$). Therefore, we subsequently aligned the protein sequence of these mutant field isolates in relation to other three hypothetical CelTOS protein derivatives from *P. vivax* genome data available in PubMed protein database (Fig 4a). Only 13 isolates (10.9%) presented sequences identical to Brazil I strain and none of our field isolates presented complete homology with North Korean and India VII strains, however both Asian strains also presented mutations in C terminal region at position 178 (Lysine for Threonine) that was not detected in our Amazon isolates. Interestingly, the N-terminal mutation at position 10 (Gly10Ser) was never detected in available sequences, but it was present in 9.2% of our field samples. Regarding the five regions studied, all isolates from Porto Velho presented full homology with Sal-1 amino acid sequence, while in other regions the frequencies of mutant sequences ranged from 21% to 44% (Fig 4b). Noting the diversity identified following the *pvceltos* gene, our data indicate that it is limited in isolates from different regions of the Brazilian Amazon. However, these two non-synonymous mutations found may have an impact on the protein folding and also influence its potential as an epitope.

Table 5. Genetic differentiation between samples from Brazil, measured by pairwise F_{ST} values.

	Novo Repartimento	Manaus	Oiapoque	Porto Velho
Novo Repartimento	-	-	-	-
Manaus	-0.015	-	-	-
Oiapoque	0.056	0.010	-	-
Porto Velho	0.036	0.015	0.196	-
Plácido de Castro	-0.004	0.048	0.143	0.123

The F_{ST} values are not significant after Bonferroni correction ($p > 0.05$).

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t005

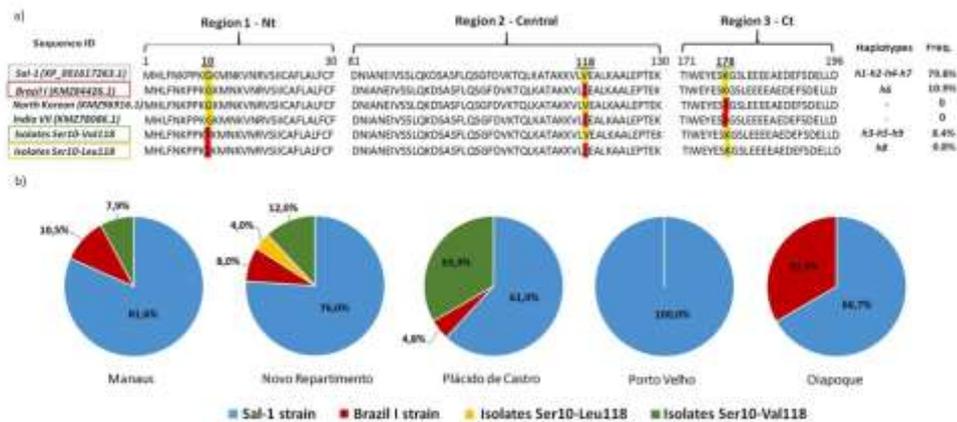


Fig 4. Alignment of protein sequences and frequency of mutations on field isolates. (A) CelTOS protein derivatives from *P. vivax* genome. The yellow mers represent the reference strain and the red mers the described mutate amino acid. (B) Frequencies of mutations in isolates from different Brazilian Amazon regions, where the colors blue, red, yellow and green represent genome identical to strains Sal-1; Brazil I and mutant isolates Ser10-Leu118 and Ser10-Val118, respectively.

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g004

Non-synonymous mutations could modify the potential of predicted B-cell epitopes but not for T_{CD8+} epitopes.

Fig 5a depicts the electrostatic potential around the mutations. The region encompassing Arg37 shows a strong negatively charged surface. The Lys178 position showed the same negative pattern, while Val118 and Gly10 are positively charged. Pro8 region is mostly neutral. Arg37 and Val118 are part of a stable alpha helix structure, whereas Pro8, Gly10, and Lys178 belong to flexible loop structures. Also, all residues are exposed to the surface, except Arg37 which is hidden inside the negative pocket. As shown in Fig 5b four high scored potential linear epitopes with at least eight amino acids were identified in the entire protein sequence (Lys6-Asn13; Gly38-Arg57; Ile136-Glu143 and Lys166-Ser191). The prediction scores ranged from 0.97 to 1.17 and no immunodominant epitopes could be identified by this approach. Considering that two of non-synonymous mutations were inserted in predicted B-cell linear epitopes (Gly10Ser and Lys178Thr), we analyzed the prediction scores of mutate epitopes. Interestingly, the C-terminal mutation Lys178Thr, observed only in Asian strains, North Korean (KMZ96916.1) and Indian VII (KMZ78086.1), resulted in a slight increase of the predicted score; while the N-terminal mutation Gly10Ser, observed in our Brazilian isolates Ser10-Val118 and Ser10-Leu118, resulted in a decrease of the predicted score for an epitope (Fig 5b). On the other hand, the predicted T_{CD8+} epitopes were conserved among all known strains and isolates, once non-synonymous mutations were not observed inside these epitopes. Analyzing the full sequence of PvCelTOS, six T_{CD8+} predicted epitopes presented consensus score smaller than 20 and were predicted to be recognized by more than 60% of analyzed HLA (Fig 5b). Among these epitopes, the sequence RVSEDAYFL (PvCelTOS₇₈₋₅₋₁₉₁) was considered a potential promiscuous T_{CD8+} epitope, since it was predicted as bonded by 81% of evaluated HLAs and presented a mean consensus score of 11.81. However, the potential of predicted epitopes as target of immune response and the effects of mutations on immune response against PvCelTOS remain unexplored.

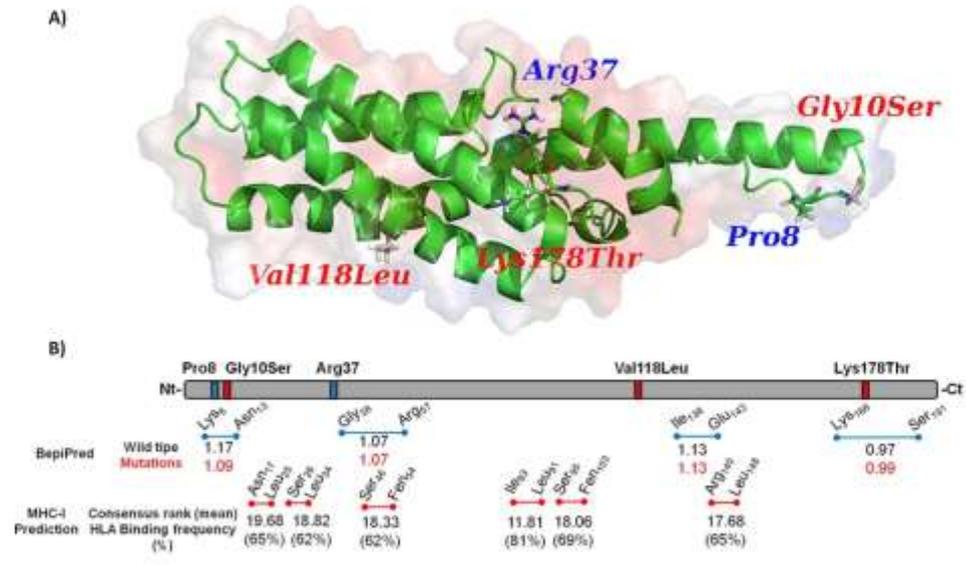


Fig 5. Modeling structure and *in silico* analysis of PvCelTOS. (A) Synonymous and non-synonymous mutations were illustrated by blue title and red title, respectively, on 3D structure of PvCelTOS. The red and blue clouds represent the negative and positive surfaces, respectively. (B) Synonymous and non-synonymous mutations found in our population and other described mutations are illustrated by blue bars and red bars, respectively, on PvCelTOS structure. The blue lines represent predicted linear B-cell epitopes and the red lines represent predicted T_{CD4+} epitopes. On both (B and T predicted epitopes) the letter and number of each epitope indicate the C-terminal and N-terminal amino acid. The BepiPred values represent the predicted score of linear B-cell epitope in wild type haplotype (H1) and mutate strain (red number). The IEDB-MHC-I indicates the mean binding prediction score of T_{CD4+} epitopes and respective HLA binding frequency among 27 evaluated HLA. No differences of prediction T-cell epitopes are observed between wild types or mutate PvCelTOS.

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g005

Discussion

Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) has been considered a potential novel alternative for a vaccine against malaria. Although the biological function is not completely elucidated, its pivotal role in the cell traversal of host cells in mosquito and vertebrate host is important to a successful hepatocyte traversal and infection. Immunologic studies have demonstrated that CelTOS is target of naturally acquired cellular [8] and humoral response in exposed individuals [9]. However, one of the major obstacles to malaria vaccine development is still the low efficiency in inducing protection, which, in part, can be explained by genetic polymorphisms encoding different proteins used as immunogens [31]. In this context, the genome sequence of various organisms and the advances in bioinformatics have revolutionized the field of vaccinology, allowing the identification of vaccine candidates presenting low antigenic variation. Actually, several studies concerning the genetic diversity of *Plasmodium* spp. have described *P. vivax* and the gene coding for antigenic determinants such as circumsporozoite surface protein (CSP) [32], Merozoite Surface Proteins (MSP) [33], Duffy Binding Protein (DBP) [34] and Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) [35]. (Reviewed by [36]). In fact, the genetic diversity of these proteins in hyperendemic areas has been described as a limiting factor for the rapid acquisition of protective immunity, and as a consequence for the development of an effective vaccine. Moreover, the antigenic polymorphism of *P. vivax*

vaccine candidates has been little discussed in unstable transmission areas such as the Brazilian endemic areas. Thus, considering that the epidemiology of malaria in Brazil presents unstable transmission and the knowledge about the genetic polymorphism of PvCelTOS remains unknown, we aimed to identify the *pvceltos* gene in isolates from different regions of the Brazilian Amazon and to study the potential impacts of the genetic diversity of PvCelTOS in protein structures and predicted epitopes.

The identification and evaluation of the genetic diversity of *pvceltos* gene in isolates from different geographic regions has not been previously studied and this was the first report. Despite the large distance among the studied localities and the possible existence of a gene flow of *Plasmodium vivax* genome among the studied populations which, associated with migration of people, could promote the gene flow of the parasite [37], our first results showed that *pvceltos* gene is highly conserved, presenting only 4 SNPs along its entire sequence, 2 synonymous and 2 non-synonymous mutations. This high conservation degree was expected, once it has been shown that CelTOS amino acid sequence is partially conserved even among three different *Plasmodium* species (*P. vivax*, *P. falciparum* and *P. berghei*) [7]. In relation to specific *P. vivax celtos* gene, there is a paucity of information available. In fact, it was described for only four different strains used in complete genome studies: Sal-1, Brazil I, North Korean and India VII. Therefore, even with the high conservation degree of *pvceltos* gene sequence in relation to the reference strain Sal-1, all these strains also presented at least one SNP. In our studied isolates, the synonymous mutation C109A was predominant and significantly higher than all other 3 mutations found, while the other synonymous mutation C24A was the least frequent mutation. It is important to mention that this predominant mutation (C109A) is also present in human P01 strain, a new reference genome for *P. vivax* from an Indonesian clinical isolate [38]. Classically, synonymous changes were thought to have no effect on the protein and were called silent, however, recent studies show that even synonymous nucleotide changes can affect protein folding and function [39–41] (Reviewed by [42]). Indeed, in most of the gene encoding proteins, the rate of synonymous substitutions is higher than the rate of non-synonymous substitutions, a condition known as purifying selection, and this has been demonstrated in other *Plasmodium* proteins, such as PfAMA-1 [43]. Interestingly, in relation to *pvceltos* we observed a perfect balance of synonymous and non-synonymous substitutions in the few polymorphisms found in all gene sequences among geographically distinct isolates.

This balance and the low diversity observed could raise at least two hypothesis: firstly, a possible low selective pressure of the immune system against this antigen, which can be corroborated by recent findings from Longley and colleagues that demonstrated a low frequency of naturally acquired antibodies against PvCelTOS in comparison with other sporozoite antigens such as CSP [44]; secondly, the high importance of this protein in sporozoite and ookinetes traversal process could be a consequence of this high conserved profile observed in the sequences of our study. Therefore, aiming to evaluate the degree of diversity of PvCelTOS in different field isolates from Brazilian Amazon, we also compared the amino acid sequence of each field isolate with the reference strain (Sal-1) and the three other hypothetical CelTOS protein derivatives from *P. vivax* genome (Brazil I, North Korean and India VII). Curiously, our isolates presented higher similarity in relation to the reference strain than to Brazil I strain which presented identical sequences in only 13 isolates. Additionally, none of our field isolates presented complete homology with North Korean and India VII strains, both Asian strains presented a mutation in C terminal region at position 178 that was not detected in our Amazon isolates. Moreover, we observed an N-terminal mutation at position 10 (Gly10Ser), which had never been detected in available sequences, but was present in 9.2% of our field samples, as isolates Ser10-Leu118 and Ser10-Val118. This mutation was present in three distant study localities (Manaus, Novo Repartimento and Plácido de Castro) and it was more frequent than

the sequence of Brazil I strain in Novo Repartimento and Plácido de Castro. Interestingly, although the distance from Novo Repartimento, Plácido de Castro and Manaus to Oiapoque could difficult the gene flow and thus explain the absence of this mutation in Oiapoque population, the low frequency of gene flow promoted by the distance would not be the reason for the absence of this mutation in populations; since Porto Velho, which is closer to Plácido Castro (the locality with the highest frequency of this mutation), did not present this mutation.

Unfortunately, due to this high similarity degree we could not determine a genetic structure based on the localities, and the sequences and haplotypes could not be eligible to construct a phylogenetic tree. However, it was possible to identify 9 different haplotypes of *pvceltos* among the 119 *P. vivax* field isolates from the Amazon regions that were analyzed. Regarding the *pvceltos* sequences, we observed that haplotype H1 and H4 were present in all studied localities, however haplotype H4 presented the highest frequency and was significantly higher when compared to the reference H1. These findings suggest a global distribution of parasites containing similar *pvceltos* genotypes. Moreover, the existence of the same haplotypes in different malaria endemic areas will be important for the rationale of malaria vaccine designs.

Like other antigens of pre-erythrocyte stage, the immunity focused on CelTOS depends on humoral and cellular immune responses [10]. Antibodies induced by immunization with *P. berghei* CelTOS were able to recognize live as well as fixed *P. berghei* sporozoites [10] and immunization with *P. falciparum* CelTOS elicits cross-species protection against heterologous challenge with *P. berghei* [9]. Despite this cross-species reactivity, the low degree of similarity between the *P. falciparum* and *P. vivax* CelTOS (63%), and the knowledge that the protection can be reduced by depleting T-cell subsets in immunized animals prior to the sporozoite challenge thus eliminating the contribution of cellular components in protection [10], make crucial the evaluation of both arms of the adaptive response against PvCelTOS to validate it as a vaccine candidate. Additionally, studies based on the genetic diversity of *P. falciparum* merozoite surface proteins, have demonstrated that non-synonymous SNPs contribute to the variability of the parasite and provide escape from host immunity [45]. Thus, to assess the targets of immune response in PvCelTOS and evaluate the potential effects of non-synonymous mutations on immune response against PvCelTOS, we used *in silico* approaches to determine differences on predicted T_{CD8+} epitopes and linear B-cell epitopes among the reference strain (Salvador-1) and mutant PvCelTOS. Firstly, four epitopes were predicted as linear B-cell epitopes on full sequence of PvCelTOS. Interestingly, non-synonymous mutations could modify the potential of these predicted epitopes, once the N-terminal and C-terminal described non-synonymous mutations (Gly10Ser and Lys178Thr) were inserted in predicted linear B-cell epitopes and affected its prediction score. We hypothesize that this finding could not justify the low frequency of responders observed in the unique work that evaluated the natural immune response against PvCelTOS on exposed individuals from Western Thailand [44], but it could indicate the genetic diversity of *Plasmodium vivax* and therefore, its possible effects on immune response can be considered in future studies. Moreover, it has been demonstrated that few amino acid changes can prejudice the binding of peptides to MHC molecules, reduce recognition by T cells or generate antagonistic peptides that inhibit activation of specific T cells by the MHC-peptide complex (Reviewed by [42]). Therefore, in relation to potential T-cell epitopes, six T_{CD8+} epitopes were predicted as hypothetical promiscuous epitopes, presenting an HLA binding frequency higher than 60% and a mean consensus rank smaller than 20. Curiously, PvCelTOS has conserved T_{CD8+} epitopes among all different strains and isolates; once there are not non-synonymous mutations inserted on any predicted T-cell epitope. This finding allied to the showed cellular response to *Plasmodium falciparum* CelTOS in exposed individuals [8] supports the necessity to identify and validate PvCelTOS T-cell epitopes that could be interesting on new vaccine approaches.

P. vivax displays almost twice as much genetic diversity as *P. falciparum* in terms of SNP diversity and gene family variability. This implies that the global population of *P. vivax* may have a capacity for greater functional variation, mainly in gene families associated with immune evasion and erythrocyte invasion. In summary, our findings in PvCelTOS indicate that the very low variations in gene sequences could suggest that this conservative profile is important to the parasite's survival and transmission. Moreover, although some studies have shown the influence of positive natural selection on genetic variability of other *P. vivax* vaccine candidates such as PvAMA-1, PvDBP and PvTRAP [46–48], our epitope prediction results indicate that the few CelTOS polymorphism in *P. vivax* is not maintained by balancing selection related to avoidance of immune recognition by the human host. However, future investigations aiming the naturally acquired cellular and humoral immune response against PvCelTOS derived antigens are still needed to corroborate the potential of PvCelTOS as a vaccine candidate.

Genes and protein sequences used

Plasmodium vivax pvCelTOS mRNA for Pv cell-traversal protein, complete CDs. Accession number: AB194053.1; S4 [*Plasmodium vivax* Sal-1] Accession number: XP_001617263.1; Hypothetical protein PVBG_00206 [*Plasmodium vivax* Brazil I] Accession number: KMZ84426.1; Hypothetical protein PVNG_01740 [*Plasmodium vivax* North Korean] Accession number: KMZ 96916.1; Hypothetical protein PVIIG_00773 [*Plasmodium vivax* India VII] Accession number: KMZ 78086.1

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. To the sequencing platform of the Program for Technological Development of Health Products (PDTIS-Fiocruz) for use of their facilities.

Author Contributions

Conceptualization: JdCLJ DMB LRPR LBC.

Formal analysis: LBC GCC JdCLJ RNRdS JHMdS.

Investigation: LBC DdSPdS RNRdS JHMdS.

Methodology: LBC RNRdS DdSPdS GCC JHMdS.

Resources: DMB RLDM JdCLJ.

Writing – original draft: LBC RNRdS JdCLJ.

Writing – review & editing: DdSPdS LRPR RLDM GCC DMB JHMdS.

References

1. W.H.O. (2015) World Malaria Report.
2. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, et al. (2010) The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e774. doi: 10.1371/journal.pntd.0000774 PMID: 20689816
3. Sanitária S-SdV (2015) DATASUS—SIVEP-MALARIA. http://200.214.130.44/sivsep_malaria/. pp. Epidemiological report of malaria cases in Brazil on period of 01/01/2015 to 2031/2012/2015.

4. Mueller I, Taimé J, Ibam E, Kundi J, Lagog M, et al. (2002) Complex patterns of malaria epidemiology in the highlands region of Papua New Guinea. *P N G Med J* 45: 200–205. PMID: 12068790
5. Ferraro B, Talbot KT, Balakrishnan A, Cisner N, Morrow MP, et al. (2013) Inducing humoral and cellular responses to multiple sporozoite and liver-stage malaria antigens using exogenous plasmid DNA. *Infect Immun* 81: 3709–3720. doi: 10.1128/IAI.00180-13 PMID: 23897618
6. Draper SJ, Angov E, Horii T, Miller LH, Srinivasan P, et al. (2015) Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *Vaccine* 33: 7433–7443. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.083 PMID: 26458807
7. Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M (2006) CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol Microbiol* 59: 1369–1379. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05024.x PMID: 16466962
8. Anum D, Kusi KA, Ganeshan H, Hollingdale MR, Ofori MF, et al. (2015) Measuring naturally acquired ex vivo IFN-gamma responses to *Plasmodium falciparum* cell-traversal protein for ookinets and sporozoites (CelTOS) in Ghanaian adults. *Malar J* 14: 20. doi: 10.1186/s12936-014-0639-5 PMID: 25604473
9. Bergmann-Letner ES, Mease RM, De La Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, et al. (2010) Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from *Plasmodium falciparum* elicits cross-species protection against heterologous challenge with *Plasmodium berghei*. *PLoS One* 5: e12294. doi: 10.1371/journal.pone.0012294 PMID: 20808868
10. Bergmann-Letner ES, Legler PM, Savranskaya T, Ockenhouse CF, Angov E (2011) Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CelTOS. *Vaccine* 29: 5940–5949. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.06.053 PMID: 21722682
11. Kusi KA, Bosomprah S, Dodoo D, Kyei-Baafour E, Dickson EK, et al. (2014) Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. *Malar J* 13: 103. doi: 10.1186/1475-2875-13-103 PMID: 24635830
12. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Diaz E, Dunachie S, Kumpitak C, et al. (2015) Acquisition and Longevity of Antibodies to *Plasmodium vivax* Preerythrocytic Antigens in Western Thailand. *Clin Vaccine Immunol* 23: 117–124. doi: 10.1128/CVI.00501-15 PMID: 26656115
13. Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gamill AW, et al. (2004) Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 52: 159–168. doi: 10.1111/j.1365-2958.2003.03974.x PMID: 15049818
14. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Taul PL, et al. (2010) Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115. doi: 10.1186/1475-2875-9-115 PMID: 20433744
15. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, et al. (2007) Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 6: 167. doi: 10.1186/1475-2875-6-167 PMID: 18093292
16. Pratt-Riccio LR, Sallenave-Sales S, de Oliveira-Ferreira J, da Silva BT, Guimarães ML, et al. (2008) Evaluation of the genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* P128 protein (SERA or SERP) and its influence on naturally acquired specific antibody responses in malaria-infected individuals living in the Brazilian Amazon. *Malar J* 7: 144. doi: 10.1186/1475-2875-7-144 PMID: 18667071
17. Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, et al. (2009) Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins* 77 Suppl 9: 89–99.
18. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2 PMID: 2231712
19. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402. PMID: 9254694
20. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, et al. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42: D222–230. doi: 10.1093/nar/gkt1223 PMID: 24288371
21. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10037–10041. doi: 10.1073/pnas.181342398 PMID: 11517324
22. Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2: 2. doi: 10.1186/1745-7580-2-2 PMID: 16635264
23. Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, Tamang D, Wang P, et al. (2012) Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Res* 40: W525–530. doi: 10.1093/nar/gks438 PMID: 22610854
24. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lambert K, et al. (2003) Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci* 12: 1007–1017. doi: 10.1110/ps.0239403 PMID: 12717023

25. Lundegaard C, Lamberth K, Hamdani M, Buus S, Lund O, et al. (2008) NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. *Nucleic Acids Res* 36: W509–512. doi: 10.1093/nar/gkn202 PMID: 18463140
26. Peters B, Sette A (2005) Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics* 6: 132. doi: 10.1186/1471-2105-6-132 PMID: 15927070
27. Sidney J, Asassrson E, Moore C, Ngo S, Pinilla C, et al. (2008) Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome Res* 4: 2. doi: 10.1186/1745-7580-4-2 PMID: 18221540
28. Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497. PMID: 14668244
29. Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595. PMID: 2613255
30. Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x PMID: 21565069
31. Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF (1993) Analysis of sequence diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol* 59: 1–14. PMID: 8515771
32. Mann VH, Huang T, Cheng Q, Saul A (1994) Sequence variation in the circumsporozoite protein gene of Plasmodium vivax appears to be regionally biased. *Mol Biochem Parasitol* 66: 45–52. PMID: 7691747
33. Putapontip C, Jongwutives S, Tanabe K, Thaithong S (1997) Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of Plasmodium vivax from Thai isolates. *Mol Biochem Parasitol* 84: 49–56. PMID: 9041520
34. Sousa TN, Ceravolo IP, Fernandes Fontes CJ, Couto A, Carvalho LH, et al. (2006) The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among Plasmodium vivax isolates from the Brazilian Amazon area. *Mol Biochem Parasitol* 146: 251–254. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.11.006 PMID: 16384615
35. Figtree M, Pasay CJ, Slade R, Cheng Q, Cloonan N, et al. (2000) Plasmodium vivax synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. *Mol Biochem Parasitol* 106: 53–66. PMID: 10802318
36. de Souza-Neiras WC, de Melo LM, Machado RL (2007) The genetic diversity of Plasmodium vivax—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 245–254. PMID: 17568929
37. Zakeri S, Safi N, Afsharipad M, Butt W, Ghasemi F, et al. (2010) Genetic structure of Plasmodium vivax isolates from two malaria endemic areas in Afghanistan. *Acta Trop* 113: 12–19. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.08.025 PMID: 19716798
38. Auburn S, Bohme U, Steinbiss S, Trimarsanto H, Hostetler J, et al. (2016) A new Plasmodium vivax reference sequence with improved assembly of the subtelomeres reveals an abundance of pir genes. *Wellcome Open Res* 1: 4. doi: 10.12688/wellcomeopenres.9676.1 PMID: 28008421
39. Chamary JV, Parmley JL, Hurst LD (2006) Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet* 7: 98–108. doi: 10.1038/nrg1770 PMID: 16416745
40. Plotkin JB, Kudva G (2011) Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* 12: 32–42. doi: 10.1038/nrg2899 PMID: 21102527
41. Schattner P, Diekhans M (2006) Regions of extreme synonymous codon selection in mammalian genes. *Nucleic Acids Res* 34: 1700–1710. doi: 10.1093/nar/gkl095 PMID: 16558911
42. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C (2011) Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* 12: 683–691. doi: 10.1038/nrg3051 PMID: 21878961
43. Veira F, Hughes AL (2000) Evidence for ancient balanced polymorphism at the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) locus of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 105: 149–153. PMID: 10613707
44. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Diaz E, Dunachie S, Kumpitak C, et al. (2016) Acquisition and Longevity of Antibodies to Plasmodium vivax Preerythrocytic Antigens in Western Thailand. *Clin Vaccine Immunol* 23: 117–124.
45. Kiwanuka GN (2009) Genetic diversity in Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997–2007. *J Vector Borne Dis* 46: 1–12. PMID: 19326702

46. Kang JM, Lee J, Cho PY, Moon SU, Ju HL, et al. (2015) Population genetic structure and natural selection of apical membrane antigen-1 in *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malar J* 14: 455. doi: [10.1186/s12936-015-0942-6](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0942-6) PMID: [26572864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26572864/)
47. Valizadeh V, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND (2014) Population genetics and natural selection in the gene encoding the Duffy binding protein II in Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Infect Genet Evol* 21: 424–435. doi: [10.1016/j.meegid.2013.12.012](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.012) PMID: [24384095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24384095/)
48. Kosuwati R, Putapornpit C, Tachibana H, Jongwutiwes S (2014) Spatial variation in genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein locus of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). *PLoS One* 9: e110463. doi: [10.1371/journal.pone.0110463](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110463) PMID: [25333779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25333779/)

9.2 Anexo II – Artigo PvCelTOS (coautoria)



***Plasmodium vivax* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites: Naturally Acquired Humoral Immune Response and B-Cell Epitope Mapping in Brazilian Amazon Inhabitants**

OPEN ACCESS

Edited by:

Clarissa B. Palatnik-de-Sousa,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

Reviewed by:

Manuel Alfonso Patarroyo,
Fundación Instituto de Immunología
de Colombia (FIDIC), Colombia
Daniel Yatsuzel Bargiel,
University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Josué de 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: 10 November 2016

Accepted: 17 January 2017

Published: 07 February 2017

Citation:

Rodrigues-da-Silva RM, Soares IF,
Lopez-Camacho C,
Martins da Silva JH,
Perce-da-Silva DS, Tava A,
Ramos Franco AM, Pinheiro FG,
Chaves LB, Pratt-Riccio LR,
Reyes-Sandoval A, Baric DM and
Lima-Junior JC (2017) *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.
doi: 10.3389/fimmu.2017.00077

Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva¹, Isabela Ferreira Soares¹, Cesar Lopez-Camacho², João Herminio Martins da Silva³, Daiana de Souza Perce-da-Silva⁴, Antônio Tava⁵, Antônia Maria Ramos Franco⁶, Francineire Gomes Pinheiro⁶, Lana Bitencourt Chaves¹, Lillian Rose Pratt-Riccio⁷, Arturo Reyes-Sandoval⁸, Dalma Maria Baric⁴ and Josué de Costa Lima-Junior^{1*}

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ²Wellfield Department of Medicine, The Jenner Institute, The Henry Wellcome Building for Molecular Physiology, University of Oxford, Oxford, UK, ³Computational Modeling Group, Fiocruz, Fortaleza, Brazil, ⁴Laboratory of Clinical Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Laboratory of Immunodiagnosics, Department of Biological Sciences, National School of Public Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁶Laboratory of Leishmaniasis and Chagas Disease, National Institute of Amazonian Research, Manaus, Brazil, ⁷Laboratory of Malaria Research, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

The cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS), a highly conserved antigen involved in sporozoite motility, plays an important role in the traversal of host cells during the preerythrocytic stage of *Plasmodium* species. Recently, it has been considered an alternative target when designing novel antimalarial vaccines against *Plasmodium falciparum*. However, the potential of *Plasmodium vivax* CelTOS as a vaccine target is yet to be explored. This study evaluated the naturally acquired immune response against a recombinant *P. vivax* CelTOS (PvCelTOS) (IgG and IgG subclass) in 528 individuals from Brazilian Amazon, as well as the screening of B-cell epitopes *in silico* and peptide assays to associate the breadth of antibody responses of those individuals with exposition and/or protection correlates. We show that PvCelTOS is naturally immunogenic in Amazon inhabitants with 94 individuals (17.8%) showing specific IgG antibodies against the recombinant protein. Among responders, the IgG reactivity indexes (RIs) presented a direct correlation with the number of previous malaria episodes ($p = 0.003$; $r = 0.315$) and inverse correlation with the time elapsed from the last malaria episode ($p = 0.031$; $r = -0.258$). Interestingly, high responders to PvCelTOS (RI > 2) presented higher number of previous malaria episodes, frequency of recent malaria episodes, and ratio of cytophilic/non-cytophilic antibodies than low responders (RI < 2) and non-responders (RI < 1). Moreover, a high prevalence of the cytophilic antibody IgG1 over all other IgG subclasses ($p < 0.0001$) was observed. B-cell epitope mapping revealed five immunogenic regions in PvCelTOS, but no associations between the specific IgG response to peptides and

9.3 Anexo III – Artigo PvTRAP (coautoria)



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 Totino⁵, Juan Camilo Sánchez-Arcila⁶, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro⁷, César López-Camacho⁸, Arturo Reyes-Sandoval⁹, Lilian Rose Pratt-Riccio³ and Josué da Costa Lima-Junior^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Hui 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-T256}; 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.