

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

**Antígenos de *Plasmodium vivax* envolvidos na invasão de reticulócitos: avaliação da resposta imune naturalmente adquirida após única exposição ao parasito**

Por

Bárbara Andreza Soares Lima

Belo Horizonte

Fevereiro  
2022

TESE-DCS IRR

B.A.S. LIMA

2022

**BÁRBARA ANDREZA SOARES LIMA**

**Antígenos de *Plasmodium vivax* envolvidos na invasão de reticulócitos:  
avaliação da resposta imune naturalmente adquirida após única exposição  
ao parasito**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, área de concentração em Doenças infecciosas e parasitárias

Orientação: Dr<sup>a</sup>. Flora Satiko Kano

Coorientação: Dr<sup>a</sup>. Camilla Valente Pires

Belo Horizonte

2022

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB 6 3740/00

L732a  
2022

Lima, Bárbara Andreza Soares

Antígenos de *Plasmodium vivax* envolvidos na invasão de reticulócitos: avaliação da resposta imune naturalmente adquirida após única exposição ao parasito/ Bárbara Andreza Soares Lima. – Belo Horizonte, 2022

XIV, 127 f.; il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 94-106

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

1. *Plasmodium vivax*/imunologia. 2. Anticorpos. 3. Células B. I. Título. II. Kano, Flora Satiko (Orientação). III. Pires, Camilla Valente (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.93

**BÁRBARA ANDREZA SOARES LIMA**

**Antígenos de *Plasmodium vivax* envolvidos na invasão de reticulócitos:  
avaliação da resposta imune naturalmente adquirida após única exposição  
ao parasito**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para Obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde, Área de Concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Banca examinadora:**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Flora Satiko Kano (IRR/FIOCRUZ) Presidente  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Kézia Katiani Gorza Scopel (UFJF) Titular  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Maristela Gomes da Cunha (UFPA) Titular  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Gregório Guilherme Almeida (IRR) Titular  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Campi Azevedo (IRR) Titular  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Araújo Fiuza Suplente

**Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 25/02/2022**



*Aos curiosos, inconformados  
e corajosos*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, afinal, por mais árdua que seja a luta e por mais difícil que seja a caminhada, existe sempre uma maneira de vencer, a fé;

À Dra. Flora, por me auxiliar em cada passo dessa longa jornada, desde os meus primeiros anos acadêmicos. Obrigada pelos desafios que me propôs e por todas as oportunidades que me ofereceu.

À Dra. Camilla, por todos os ensinamentos e inspiração.

À Dra. Luzia, pelas valiosas contribuições ao longo de todo o meu trabalho e jornada acadêmica;

Aos demais professores do curso, pelos ensinamentos;

À Plataforma de Sequenciamento e a Plataforma de Citometria, pelo fornecimento da infraestrutura.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, pela oportunidade;

À Biblioteca do IRR, pelo acesso gratuito à informação técnico-científica, mantida por recursos públicos federais;

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Em especial, à CAPES pela concessão da minha bolsa de doutorado e às demais agências de fomento à pesquisa NIH, CNPq, FAPEMIG e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do IRR/ FIOCRUZ pela infraestrutura e recursos.

A todos os habitantes de Sousa, que com sua boa vontade e simpatia tornaram esse estudo possível. E aqueles de Rio Pardo, os quais eu agradeço por nunca deixarem de colaborar e me permitirem estar algumas vezes na casa de cada um de vocês. Sem dúvidas eu sou uma pessoa melhor depois de ter ouvido todas as histórias de vida e experiências de vocês.

A minha família que respeitou e me permitiu viver meus sonhos, mesmo que eles fossem muito diferentes dos deles.

Ao Igor que, que está sempre me desafiando, ajudando a crescer e compartilhando dos meus sonhos;

Aos meus amigos, por me fazerem compreender que amizades verdadeiras permanecem mesmo quando seguimos caminhos diferentes;

Aos amigos da pós-graduação, sempre dispostos a ajudar;

A Jéssica, Letícia, Dani, Daniel e Michele por todos os momentos que compartilhamos não só as alegrias, mas também as tristezas. Obrigada por toda a paciência e dedicação. Vocês são muito especiais!

A Gabriela Maia que contribuiu de forma especial para que esse trabalho pudesse ser concluído.

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisas de Biologia Molecular e Imunologia da Malária, que foram importantes nesta jornada. Vocês me ensinaram mais do que podem imaginar! Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Isso também passa...*

*Maria de Nazaré*

## RESUMO

O processo de invasão do *Plasmodium vivax* aos reticulócitos é complexo, essencial para o sucesso da infecção e coincide com o aparecimento dos sintomas clínicos da doença. Portanto, proteínas envolvidas nesse processo constitui alvos no desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax*. Recentemente estudos têm demonstrado que a combinação de múltiplos antígenos tem efeito protetor contra a doença em mais de 90%, dos quais incluem a *Duffy binding protein II* (DBPII) e a recém descrita *Erythrocyte Binding Protein* (EBP2), uma proteína paróloga da DBPII. No entanto, o efeito protetor conferido pela associação DBPII/EBP2 foi observado apenas para variante homóloga da DBPII. Para contornar o efeito da diversidade genética de DBPII sobre o sistema imune, o imunógeno sintético baseado na DBPII, denominado de DEKnull-2, foi construído para induzir anticorpos capazes de bloquear a interação entre diferentes alelos DBPII e seu receptor cognato em reticulócitos, o qual, tem mostrado resultados promissores. Buscando contribuir no desenvolvimento de uma vacina, o conhecimento sobre a aquisição e longevidade da resposta imune naturalmente adquirida para DEKnull-2 e EBP2, bem como o estabelecimento de células B de memória (MBCs) de longa duração são necessários. Com a vantagem de estudar uma população exposta uma única vez a um surto de malária causado por *P. vivax* fora da região endêmica brasileira, numa primeira etapa, avaliamos a aquisição e longevidade da resposta de anticorpos IgM e IgG contra as EBP2, DBPII e DEKnull-2, e a proteína bem caracterizada e imunogênica MSP1-19. Para isso, realizamos um acompanhamento de 12 meses dos indivíduos expostos (16 casos e 22 não caso) em quatro cortes transversais com intervalo de 3 meses. Os nossos resultados mostram que uma única exposição ao *P. vivax* não foi suficiente para induzir níveis relevantes de IgM ou IgG contra EBP2, DBPII ou DEKnull-2. No entanto, após infecções de *P. vivax* recorrentes houve um aumento expressivo na resposta de IgG contra DBPII e DEKnull-2, sendo essa resposta estável para DEKnull-2 ao longo de 12 meses. Polimorfismo no gene *ebp2* não parece explicar a baixa resposta de anticorpos contra EBP2, uma vez o isolado de *P. vivax* do surto mostrou alta identidade com o isolado referência (proteína recombinante utilizada nos ensaios sorológicos). Embora pouco imunogênica em indivíduos expostos uma única vez ao *P. vivax*, a EBP2 foi altamente imunogênica em indivíduos com longa exposição à malária, com frequência de respondedores que variaram de 35% a 92%, dependendo do número de episódios de malária. Na segunda etapa, avaliamos a longevidade da resposta de células B de memória (MBCs) contra DBPII e DEKnull-2 após 13 anos a ocorrência do surto de malária. Apesar dos anticorpos antígeno-específicos contra *P. vivax* não serem detectados após 13 anos da única exposição, MBCs antígeno-específicas ainda foram detectadas. Especificamente, 44% dos indivíduos caso apresentaram MBCs diferenciadas em células secretoras de anticorpos (ASCs) específicas para DEKnull-2 e 33% para DBPII. Além disso, a resposta de ASCs para DEKnull-2 teve maior amplitude comparada com a DBPII. Uma análise de correlação dos dados de sorologia IgM e IgG com o perfil de subpopulações de células B mostrou correlação positiva com anticorpos contra DBPII e MBCs atípicas enquanto para DEKnull-2 a correlação foi significativa com as MBCs clássicas. Em conjunto, o presente trabalho mostra que a EBP2 apesar de pouco imunogênica após uma breve exposição ao *P. vivax*, é altamente imunogênica em indivíduos com longa exposição à malária. Além disso, nossos resultados reforçam o potencial da DEKnull-2 como um importante candidato vacinal contra o *P. vivax*.

**Palavras-chave:** *Plasmodium vivax*, anticorpos, células B de memória, EBP2, DEKnull-2

## ABSTRACT

*Plasmodium vivax* blood-stage invasion process into reticulocytes is complex, critical for parasite development, and associated with clinical disease. Therefore, blood-stage proteins are targets for vaccine development against *P. vivax*. Recently, studies have been demonstrated that combination of multiple *P. vivax* proteins showed strong protective effect (>90%), including Duffy binding protein II (DBPII) and novel Erythrocyte Binding Protein (EBP2), a DBPII paralog. However, the association of DBPII/EBP2 was found only against a homologous DBPII allele. To overcome the genetic diversity of the DBPII, the engineering vaccine DEKnull-2 was constructed to induce inhibitory antibodies able to block the interaction between different DBPII allele and its cognate receptor on DARC positive reticulocytes, that it has showed promised results. Thus, the understanding of acquisition and longevity of natural immune response against DEKnull-2 and EBP2, as well as the generation of long-term memory B cells (MBCs) response are necessary for development of an effective vaccine against *P. vivax*. Here, we took advantage of a small outbreak of *P. vivax* malaria, located in a non-endemic area of Brazil, firstly, we investigated the acquisition and longevity of IgM/IgG antibodies against EBP2, DBPII, DEKnull-2, and well-characterized and immunogenic MSP1-19, among individuals who had their first and brief exposure to *P. vivax*. In the outbreak area, the experimental approach included 4 cross sectional surveys at 3-month interval (12-month follow-up) including exposed individuals (16 cases, and 22 non-cases). The results demonstrated that while a brief initial *P. vivax* infection was not efficient to induce IgM/ IgG antibodies to EBP2, DBPII or DEKnull-2, IgG antibodies against DBPII and DEKnull-2 (but not EBP2) were boosted by recurrent blood-stage infections, with a stable IgG response against DEKnull-2 within 12 months. Polymorphism in the *ebp2* gene does not seem to explain EBP2 low immunogenicity as the *ebp2* allele associated with *P. vivax* outbreak presented high identity to the original EBP2 isolate used as recombinant protein. Although EBP2 antibodies were barely detectable after a primary episode of *P. vivax* infection, EBP2 was highly recognized by long-term malaria-exposed Amazonian range from 35% to 92% according to previous malaria episodes. In the next step, we evaluated the longevity of MBCs response to DBPII and DEKnull-2 after 13 years of the outbreak. Although the antigen-specific antibodies did not detect 13-years after a single and brief *P. vivax* exposure, MBCs were detected. Specifically, 44% of case individuals showed the differentiation of MBCs in antibody secreting cells (ASCs) for DEKnull-2, and 33% for DBPII. The higher levels of ASCs were observed for DEKnull-2 than DBPII. Correlation analysis between IgM/IgG specific-antibodies and MBCs subset showed a positive correlation between antibodies against DBPII and atypical MBCs, while DEKnull-2 antibodies positively correlated with classical MBCs. Taken together, our results showed EBP2 was poor immunogenic after a single and brief *P. vivax* exposure, but it is highly immunogenic after long-term malaria exposure. Furthermore, our results highlighted the potential of DEKnull-2 as a vaccine candidate.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, antibodies, memory B cells, EBP2, DEKnull-2

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida do <i>P. vivax</i>	19
<b>Figura 2.</b> Localização das áreas de estudo	39
<b>Figura 3.</b> Desenho experimental do estudo	41
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática dos iniciadores desenhados para sequenciamento do domínio DBL da proteína EBP2 do isolado referente ao surto de Sousa	45
<b>Figura 5.</b> Estratégia de análise por citometria de fluxo para fenotipagem de subpopulações de células B	49
<b>Figura 6.</b> Estratégia de análise por citometria de fluxo para fenotipagem de subpopulações de células plasmáticas	50
<b>Figura 7.</b> Resposta de anticorpos IgM contra antígenos de fase sanguínea de <i>P. vivax</i> no surto de malária	55
<b>Figura 8.</b> Resposta de anticorpos IgG a antígenos de fase sanguínea de <i>P. vivax</i> no surto de malária	56
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da estrutura das proteínas DBP e EBP2	57
<b>Figura 10.</b> Alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio DBL da proteína EBP2 (aa 68 a 535) isolada da amostra S17 do Surto de Sousa	58
<b>Figura 11.</b> Análise em <i>Pseudo-heatmap</i> da resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea nos indivíduos expostos ao surto de malária pelo <i>P. vivax</i> em Sousa	60
<b>Figura 12.</b> Resposta de anticorpos IgG contra antígenos de fase sanguínea de <i>P. vivax</i> entre indivíduos com diferentes números de episódios prévios de malária	62
<b>Figura 13.</b> Avaliação da produção de células secretoras de anticorpos (ASCs) IgG total em indivíduos exposto (caso e não caso) e não exposto ao surto autóctone ocorrido há 13 anos no distrito de Sousa, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais.	65
<b>Figura 14.</b> Células Secretoras de anticorpos (ASCs) IgG+ antígeno específicas de <i>P. vivax</i> em indivíduos residente em Sousa expostos (caso e não caso) e não expostos (controle da área) ao surto de malária	67
<b>Figura 15.</b> Células B total CD19 <sup>+</sup> em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária	70
<b>Figura 16.</b> Células B imaturas (CD19 <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup> ) em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária	71
<b>Figura 17.</b> Células B <i>Unswitched</i> (CD19 <sup>+</sup> CD10 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> ) e <i>Switched</i> (CD19 <sup>+</sup> CD10 <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> ) em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária	72
<b>Figura 18.</b> Células B Naive (CD19 <sup>+</sup> CD10 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD21 <sup>+</sup> ) em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária	73

<b>Figura 19.</b> Subpopulações de células B de memória em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária.	75
<b>Figura 20.</b> Células plasmáticas de curta (CD38 <sup>+</sup> ) e longa (CD138 <sup>+</sup> ) duração em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 12 anos após o surto de malária	76
<b>Figura 21.</b> Correlação entre os níveis de anticorpos IgM e IgG e subpopulações de células B para os antígenos de <i>P. vivax</i>	78
<b>Figura 22.</b> Expressão diferencial dos genes relacionadas à imunidade inata e adaptativa em PBMCs coletadas 13 anos após o surto de malária estimuladas com DBPII avaliados pela PCRarray em indivíduos expostos não caso (S05 e S40) e caso (S24 e S39).	80
<b>Figura 23.</b> Rede de interação dos processos biológicos em que os transcritos positivamente expressos no grupo caso estão associados pela análise de Gene Ontology	81
<b>Figura 24.</b> Rede de interação dos processos biológicos dado pelo programa Gene Ontology para o grupo não caso	83



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Lista de anticorpos utilizados para o ensaio de citometria de fluxo	50
<b>Quadro 2:</b> Componentes celulares e função molecular dos genes <i>up</i> -regulados em indivíduos caso	83
<b>Quadro 3.</b> Componentes celulares e função molecular dos genes <i>up</i> -regulados em indivíduos não caso.	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características demográficas, epidemiológicas e imunológicas dos indivíduos expostos ao surto de <i>P. vivax</i> em Sousa na linha de base	53
<b>Tabela 2</b> – Fatores de risco associados com a resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea de <i>P. vivax</i>	63
<b>Tabela 3.</b> Categorização da resposta de ASCs IgG+ antígeno específica de <i>P. vivax</i> .	66
<b>Tabela 4.</b> Proporção de ASCs antígeno- específicas para as proteínas MSP1-19, DBPII e DEKnull-2 em relação ao total de ASCs IgG+	68
<b>Tabela 5.</b> Genes exclusivamente <i>up</i> -regulados em indivíduos do grupo não-caso e caso obtidos pela análise de z-score ( $z\ score > 0,5$ )	81

## Sumário

1	INTRODUÇÃO .....	15
1.1	Situação atual da malária .....	15
1.2	Ciclo biológico.....	17
1.2.1	Invasão dos eritrócitos humanos pelo <i>P. vivax</i> .....	19
1.3	Resposta imune naturalmente adquirida contra malária .....	21
1.3.1.	Resposta de anticorpos contra proteínas de estágios sanguíneos de <i>P. vivax</i> candidatas à vacina .....	23
1.3.2	Células B de memória na malária .....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVO.....	37
3.1	Objetivos específicos .....	37
4	METODOLOGIA .....	38
4.1	Surto de malária pelo <i>P. vivax</i> em área não endêmica.....	38
4.2	Voluntários e coleta de sangue .....	39
4.2.1	Indivíduos primoinfectados em surto de <i>P. vivax</i> fora da área endêmica.....	39
4.2.2	Indivíduos residentes em área de transmissão ativa de malária.....	41
4.3	Processamento das amostras de sangue: obtenção de plasma e das células mononucleares do sangue periférico ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> – PBMC).....	42
4.4	Proteínas recombinantes .....	42
4.4.1	Erythrocyte Binding Protein 2 (EBP2).....	42
4.4.2	Duffy binding protein de <i>P. vivax</i> (DBPII) e imunógeno sintético baseado na DBPII (DEKnull-2) .....	43
4.4.3	Proteína de superfície do merozoíto 1 de <i>P. vivax</i> (MSP1-19).....	43
4.5	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgM e IgG contra EBP2, DBPII DEKnull-2 e MSP1-19 .....	43
4.6	Reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene <i>ebp2</i> do isolado do surto de <i>P. vivax</i> .....	44
4.7	Sequenciamento do gene <i>ebp2</i> do isolado do surto de <i>P. vivax</i> .....	45
4.8	Cultura das PBMCs e ativação policlonal das células B de memória circulantes .....	46
4.9	Ensaio imunoenzimático (ELISpot) para detecção de células B memória antígeno-específicas de <i>P. vivax</i> .....	46
4.10	Cultura e avaliação fenotípica de subpopulações de células B.....	47
4.11	Estratégia de análise para definição de subpopulações de células B pela citometria de fluxo .....	48

4.12 Extração de RNA e PCR Array para análise diferencial de expressão gênica relacionada à imunidade inata e adaptativa .....	51
4.13 Análises Estatísticas.....	52
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Perfil da resposta de anticorpos IgM e IgG antígeno específicos em indivíduos expostos ao surto autóctone de <i>P. vivax</i> .....	52
5.2 Sequenciamento do gene <i>ebp2</i> do isolado de <i>P. vivax</i> do surto de malária.....	56
5.3 Influência dos episódios de recorrência de <i>P. vivax</i> na resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea em primo-infecção.....	58
5.4 Avaliação do número de episódios prévios de malária na aquisição de anticorpos IgG contra antígenos de <i>P. vivax</i> .....	60
5.5. Avaliação da resposta de células B de memória antígeno-específicas em indivíduos expostos ao surto autóctone de <i>P. vivax</i> por ELISpot.....	64
5.6 Avaliação do perfil imunofenotípico de PBMCs de indivíduos expostos ao surto de malária após estímulo específico .....	68
5.7 Correlação entre os níveis de imunoglobulinas e subpopulações de células B para os antígenos de <i>P. vivax</i> .....	77
5.8 Perfil da expressão diferencial dos genes relacionados a resposta imune inata e adaptativa de PBMCs de indivíduos expostos ao surto de malária após 13 anos.....	78
6. DISCUSSÃO.....	85
6.1 Perfil da resposta de anticorpos IgM e IgG ao longo de 12 meses contra proteínas de <i>P. vivax</i> envolvidas no processo de invasão de reticulócitos (EBP2, DBPII e DEKnull-2) após curta e única exposição a esse parasito .....	85
6.2 Estabelecimento de memória imunológica de longa duração aos antígenos relacionados à invasão pelo <i>P. vivax</i> após exposição única.....	88
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	93
8. BIBLIOGRAFIA .....	94
APÊNDICE I – Artigo Científico.....	107
ANEXO I - Questionário aplicado aos indivíduos participantes do estudo .....	123
ANEXO II - Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes do estudo .....	124
ANEXO III – Lista de gene avaliados no PCRarray .....	126

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Situação atual da malária

A malária é uma das doenças infecto-parasitárias de maior importância na saúde pública mundial e amplamente distribuídas nas regiões de clima tropical e subtropical do planeta. Desde o ano 2000, investimentos maciços têm sido direcionados ao combate à malária, visando o controle e eliminação da doença. De fato, até o ano de 2015 foi observada uma expressiva redução no número de casos registrados, no entanto essa tendência não foi mantida nos últimos anos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), houve um aumento no número de casos de 211 milhões em 2015 para 241 milhões em 2020. Além de um aumento no número de casos em 2020, também houve aumento no número de óbitos de 558.000 em 2019 para 627.000. Acredita-se que esse aumento no número de óbitos se deve principalmente a interrupção de serviços de prevenção à malária na África durante a pandemia de COVID-19 (WHO, 2021).

Das seis espécies de plasmódio que causam malária em humanos (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. simium*), o *P. vivax* é a espécie de maior distribuição geográfica e que mais acomete o homem fora da África. Estima-se que em 2020, o *P. vivax* tenha sido responsável por causar malária em 4.5 milhões de pessoas (WHO, 2021). Nas américas, a malária é endêmica em 19 países e a espécie *P. vivax* responde por 80% dos casos de malária na região (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Na América do Sul, os países Brasil, Colômbia e Venezuela representaram juntos cerca de 77% dos 232.000 casos registrados em 2020 no continente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; WHO, 2021). No Brasil, a região da Amazônia legal, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é considerada endêmica para malária compreendendo 99% dos casos notificados. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Em 2020, foram registrados 145.188 casos de malária, uma redução de 7,8% em relação ao ano anterior (2019), dos quais a espécie *P. vivax* foi responsável por 89% dos casos. Dados preliminares do Ministério da Saúde apontam uma tendência de queda, já que houve uma redução de 12,5% (57.374) dos casos notificados no primeiro semestre de 2021 em relação ao mesmo período de 2020 (65.558) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). A redução da morbidade e mortalidade da malária são reflexos principalmente de investimentos em programas de controle e prevenção por parte do Ministério da Saúde, que visam o diagnóstico

e tratamento precoce dos casos clínicos, bem como controle vetorial (FERREIRA; CASTRO, 2016; GRIFFING et al., 2015; SAMPAIO et al., 2015). No entanto, apesar da redução no número de casos, o ano de 2020 apontou um aumento de 18,9% (44) nos óbitos por malária em relação a 2019 (37 óbitos), fato possivelmente explicado pelo aumento de casos de malária causada por *P. falciparum* no país, ou ainda pela pandemia de COVID-19, que pode ter contribuído pela demora na busca de diagnóstico e tratamento adequado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Ainda que os dados apontem para uma tendência na redução no número de casos de malária no Brasil, a doença ainda é considerada de difícil controle no território devido a fatores como: (i) intenso e descontrolado movimento populacional, relacionado com a busca por melhores condições de vida entre estados e municípios brasileiros ou países vizinhos, como Venezuela e Peru (CARLOS et al., 2019); (ii) presença do mosquito vetor em praticamente todo o território brasileiro (MELO et al., 2020); (iii) surgimento de infecções assintomáticas ou submicroscópicas (ALMEIDA et al., 2021; AMARAL et al., 2019); e (iv) expansão de parasitos resistentes as drogas atualmente disponíveis (FERREIRA et al., 2021).

Os casos de malária notificados fora da região endêmica brasileira também podem ser apontados como um dos desafios no controle e eliminação da malária no país. Em grande parte, os casos extra-amazônicos são notificados como importados da área endêmica brasileira, de países vizinhos com transmissão ativa ou de indivíduos regressos do continente africano (CARLOS et al., 2019). Apesar de representarem apenas 1% do total de registros, esses casos merecem especial atenção uma vez que eles podem atuar como caso índice de surtos da doença. Na área não endêmica, a taxa de letalidade chega a ser cerca de 123 vezes maior que a registrada na região endêmica. Enquanto que a chance de uma pessoa morrer de malária na região endêmica é de apenas 0,02%, essa taxa sobe para 2,04% na região extra-amazônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Isso porque fora de área endêmica a suspeita de malária não é imediata, e a demora para iniciar o tratamento adequado do paciente pode levar ao agravamento do quadro e maior risco de vir a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Contudo, os casos importados não são os únicos responsáveis pela transmissão de malária na região extra-amazônica. Transmissão autóctone tem sido registrada ao longo da área de mata Atlântica brasileira nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, e Paraná (CARLOS et al., 2019; DE PINA-COSTA et al., 2014). Em regiões de Mata Atlântica, o

principal vetor apontado como transmissor de malária é o mosquito *Anopheles (kerteszia) cruzii*. Este vetor é capaz de realizar o repasto sanguíneo em copas de árvores e próximo ao solo, podendo infectar primatas não-humanos e o homem, fato que ajudou a descrever o perfil zoonótico da malária na região de Mata Atlântica (BRASIL et al., 2017; DE ALVARENGA et al., 2018). A espécie *Plasmodium simium* tem sido descrita como o causador de malária nessa região. Dessa forma, indivíduos em contato com as áreas de mata atlântica podem estar sob o risco de contrair a malária (BRASIL et al., 2017; DE ALVARENGA et al., 2018).

Em Minas Gerais (MG) a transmissão da malária é baixa, apesar do estado possuir fatores que podem contribuir na disseminação da doença, como a presença do vetor e o fluxo migratório de indivíduos infectados em áreas endêmicas. Focos de transmissão autóctone já foram descritos em diversas cidades do estado, como Montalvânia, Mantena, Uberlândia, Monte Alegre de Minas, Sousa e Diamantina (BENTES; COSTA; TEIXEIRA, 2018; CERAVOLO et al., 2009; CHAVES et al., 1995; FONTES; BATHURST; KRETTLI, 1991; LIMONGI et al., 2008). No período de 2010 a 2018, MG registrou 703 casos de malária (SES-MG, 2018).

## 1.2 Ciclo biológico

Parasitas do gênero *Plasmodium spp* possuem um complexo ciclo biológico que envolve dois hospedeiros: (1) hospedeiro invertebrado – fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles* – onde ocorre a fase de multiplicação sexuada; e (2) hospedeiro vertebrado – o homem, onde ocorre a fase assexuada do ciclo biológico (CROMPTON et al., 2014; MUELLER et al., 2009).

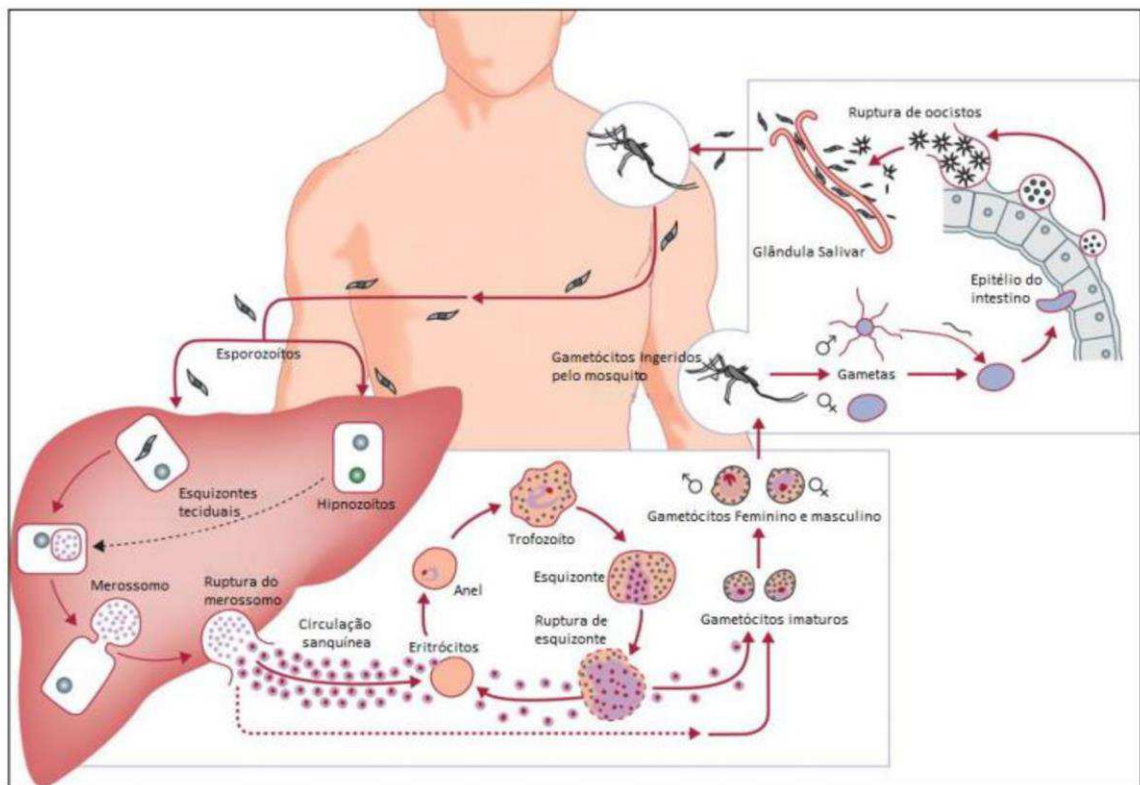
No homem a infecção se inicia com a inoculação de esporozoítos (formas infectantes) na derme durante o repasto sanguíneo de fêmeas anofelinas infectadas (GUEIRARD et al., 2010) (Figura 1). Parte desses esporozoítos atingem a corrente sanguínea, migram através de células de Kupffer e hepatócitos até que se estabelecem em uma das células do fígado (TAVARES et al., 2013), dando início do ciclo hepático que ocorre de forma assintomática no homem. Nos hepatócitos ocorre a formação do vacúolo parasitóforo dando continuidade ao processo de esquizogonia. Nesta etapa, diferentemente de *P. falciparum*, a espécie *P. vivax* pode desenvolver formas latentes denominadas de hipnozoítos que podem ficar latentes durante semanas ou meses nos hepatócitos (KROTOSKI, 1985; WHITE, 2011). A reativação de hipnozoítos pode levar a um novo quadro de malária clínica (recaídas) com potencial para

infectar novos mosquitos, e conseqüentemente infectar um novo hospedeiro humano (WHITE, 2011). Os esporozoítos, no interior do vacúolo parasitóforo, sofrem sucessivos ciclos de multiplicação assexuada e diferenciação dando origem a milhares de merozoítos (HOLZ; FERNANDEZ-RUIZ; HEATH, 2016) que serão liberados diretamente na corrente sanguínea por brotamento de vesículas, conhecidas como merossomos (STURM, 2006). Livres na corrente sanguínea, os merozoítos rapidamente reconhecem as células alvos, as células vermelhas, onde iniciam o processo de invasão (COWMAN et al., 2016) que envolve uma série de etapas sucessivas mediadas por interações moleculares específicas do tipo ligante/receptor entre proteínas do parasito e os receptores das células alvo (PETTER; DUFFY, 2015).

Estabelecida a invasão nos eritrócitos e formação do vacúolo parasitóforo, ocorre uma extensa multiplicação assexuada que originará entre 16-36 novos merozoítos. Esses novos parasitos serão liberados na corrente sanguínea através do rompimento da membrana dos eritrócitos reiniciando o ciclo de invasão, a cada 48 horas para as espécies *P. vivax* e *P. falciparum* (COWMAN et al., 2016). Essa etapa do ciclo, coincide com o aparecimento dos sintomas clínicos da malária como febre, dor de cabeça, calafrios, náusea e fraqueza que estão associados com a liberação de moléculas, como o glicofosfatidilinositol (GPI) e hemozoína ligada a DNA do parasito, que vão atuar como fatores pirogênicos na circulação (ANSTEY et al., 2009). Um vez na circulação, esses pirogênicos ativam o sistema imune produzindo uma resposta inflamatória, que pode direta ou indiretamente contribuir para a eliminação da infecção (LIMA-JUNIOR; PRATT-RICCIO, 2016). Parte dos merozoítos darão origem as formas sexuadas feminina e masculina do parasito (gametócitos) que são infectantes para o mosquito vetor (SINDEN, 1983). O aparecimento de gametócitos de *P. falciparum* na circulação periférica ocorre de forma concomitante com os sintomas clínicos iniciais (8 a 11 dias após a infecção) (COWMAN et al., 2016; MEIBALAN; MARTI, 2017), enquanto para *P. vivax* já é possível observar gametócitos circulantes antes de qualquer sintoma (até 7 dias após a infecção) (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011; VALLEJO et al., 2016). No momento do repasto sanguíneo, as fêmeas do mosquito de anofelinos ingerem os gametócitos femininos e masculinos que atingem o intestino médio, fecundam e formam o zigoto diplóide. Posteriormente, haverá o desenvolvimento dos oocinetos móveis, oocistos que se maturam e diferenciam em esporozoítos que se maturam nas glândulas salivares e estarão aptos para infectar os anofelinos e dar continuidade ao ciclo biológico (CROMPTON et al., 2014; MEIBALAN; MARTI, 2017).



**Figura 1. Ciclo de vida do *P. vivax*.** O ciclo de vida do parasito da malária ocorre em duas fases, uma em hospedeiro invertebrado (mosquito) e outra em hospedeiro vertebrado (homem). No momento do repasto sanguíneo o mosquito inocula no homem os esporozoítos que são formas infectantes que serão direcionadas até o fígado. Nos hepatócitos os esporozoítos irão se diferenciar em merozoítos sendo posteriormente liberados na corrente sanguínea (fase pré-eritrocítica). Na circulação, os merozoítos rapidamente vão infectar as células vermelhas do sangue e após sucessivos ciclos de multiplicação romperão essas células infectando outras novas. Parte desses merozoítos vão ainda se diferenciar em gametócitos que serão infectantes para mosquitos, dando continuidade ao ciclo de vida da malária.



(Adaptado de Mueller e colaboradores (2009)).

### 1.2.1 Invasão dos eritrócitos humanos pelo *P. vivax*

A invasão dos eritrócitos pelo parasito da malária é a etapa do ciclo que garante o sucesso da infecção humana, sendo esse processo complexo, rápido e envolvendo várias etapas de ligação entre ligantes do parasito e receptores nos eritrócitos (COWMAN et al., 2017).

Inicialmente, o contato entre os merozoítos e eritrócitos é mediado por interações de baixa afinidade, principalmente pelas proteínas de superfície do merozoíto (MSP) (BEESON et al., 2016). A etapa seguinte, implica na reorientação da extremidade apical do parasito voltando-a para a superfície do eritrócito através da exposição de proteínas de micronema, como o antígeno de membrana apical-1 (AMA1)(ALAGANAN; SINGH; CHITNIS, 2017;

COWMAN et al., 2017). Em seguida ocorre a etapa da junção irreversível através de ligações de alta afinidade mediada por proteínas da família *Duffy binding-like* (DBL ou *Erythrocyte binding-like*- EBL). Nessa etapa final enquanto *P. falciparum* pode utilizar diferentes vias para concluir o processo de invasão em hemácias de qualquer idade, o *P. vivax*, só possui uma via de invasão conhecida restrita aos reticulócitos (hemácias jovens) (ALAGANAN; SINGH; CHITNIS, 2017; COWMAN et al., 2017; COWMAN; CRABB, 2006).

Até o momento, a única via de invasão bem descrita do *P. vivax* ocorre através da ligação da proteína de micronema *Duffy Binding Protein* (DBP) ao seu receptor nos eritrócitos, o antígeno do grupo sanguíneo Duffy/receptor de quimiocinas (DARC) (ADAMS et al., 1990, 1992). Inclusive, até pouco tempo era consenso na literatura que indivíduos que não expressavam o receptor DARC na superfície dos reticulócitos não eram susceptíveis a infecção por *P. vivax* (MILLER et al., 1976). No entanto os recentes relatos de indivíduos DARC negativos infectados com *P. vivax* tem levantado questionamento acerca da exclusividade da DBP como única via de invasão desse parasito (GOLASSA et al., 2020; GUNALAN et al., 2016; KEPPEL et al., 2021; POPOVICI; ROESCH; ROUGERON, 2020). Além da DBP, recentemente se tornou conhecida outra proteína capaz de se ligar a reticulócitos DARC positivos, a *Erythrocyte Binding Protein 2* (EBP2), que possui características semelhantes as proteínas da família DBL/EBL que são importantes no processo de invasão dos merozoítos as células alvo, se tornando uma possível via alternativa na invasão do *P. vivax* (HESTER et al., 2013; NTUMNGIA et al., 2016).

Dada a importância do ciclo sanguíneo na malária vários estudos que visam o desenvolvimento de uma vacina contra o *Plasmodium sp* trazem como alvo proteínas dessa fase do ciclo biológico do parasito (BEESON et al., 2019; MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015). No caso do *P. vivax*, visto a alta dependência da DBP no processo de invasão desse parasito e o fato anticorpos capazes de bloquear a interação dessa proteína ao seu receptor estarem correlacionados a proteção clínica (KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016) fazem dessa proteína a principal candidata a compor uma vacina contra esse parasito (PAYNE et al., 2017; SINGH et al., 2018). Estudos recentes ainda mostram que direcionar a resposta imune a mais de uma proteína presente no processo de invasão é uma estratégia capaz de promover níveis mais altos de inibição da invasão do parasito e consequente imunidade clínica, sugerindo que uma vacina que contemple mais de um antígeno seja uma boa estratégia no combate ao *P. vivax* (FRANÇA et al., 2017; HE et al., 2019). Ainda visando o desenvolvimento de uma vacina se

torna imprescindível conhecer os mecanismos que podem favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente e de longa duração.

### **1.3 Resposta imune naturalmente adquirida contra malária**

O estabelecimento da imunidade naturalmente adquirida contra a malária é atingida após sucessivas infecções (KOCH, 1900; Langhorne et al., 2008). Em uma primo-infecção, os indivíduos tendem a desenvolver uma doença aguda e febril e após repetidas infecções, a doença tende a evoluir para a forma mais branda (subclínica) podendo até mesmo estar ausente, como observado na malária assintomática (LANGHORNE et al., 2008; SAN et al., 2022). A diferença na sintomatologia da doença é atribuída principalmente ao estabelecimento da imunidade naturalmente adquirida, sendo os anticorpos os principais componentes (COHEN; MCGREGOR; CARRINGTON, 1961).

A importância dos anticorpos IgG na imunidade contra a malária foi demonstrada pela transferência passiva de anticorpos IgG de adultos imune para crianças que tiveram redução da parasitemia e sintomas clínicos da doença (COHEN; MCGREGOR; CARRINGTON, 1961; SABCHAREON et al., 1991). No entanto, os mecanismos que induzem a imunidade adquirida contra a malária são complexos e seu conhecimento ainda é limitado, especialmente contra o *P. vivax* (ANTONELLI et al., 2020). Já foi demonstrado que alguns fatores podem influenciar na aquisição, amplitude e magnitude da imunidade contra malária, como idade e fatores genéticos do hospedeiro; exposição prévia à malária; além de espécie e variabilidade do parasito (FOWKES; BOEUF; BEESON, 2016; MUELLER et al., 2013; NOGARO et al., 2011). Um exemplo é a diversidade genética do parasito que pode atuar como um mecanismo de escape do sistema imune humano (SCHERF; LOPEZ-RUBIO; RIVIERE, 2008; TAKALA; PLOWE, 2009), constituindo um desafio no desenvolvimento de vacinas, já que os anticorpos induzidos parecem ser variante-específicos, justificando a necessidade de repetidas infecções para a aquisição de anticorpos contra uma ampla diversidade de parasitos (MARSH; KINYANJUI, 2006).

Estudos imuno-epidemiológicos em áreas com diferentes níveis de endemicidade mostram que a aquisição da imunidade naturalmente adquirida acontece de forma mais rápida para o *P. vivax* comparado ao *P. falciparum* (MAITLAND et al., 1996; MARCHESINI et al., 2001; MICHON et al., 2007; PHIMPRAPHI et al., 2008). Nessas áreas, enquanto a diminuição da incidência e desaparecimento de sintomas clínicos em infecção por *P. vivax* foi observada

em crianças a partir dos 5 anos de idade, o mesmo fenômeno só foi observado para *P. falciparum* em crianças na faixa da pré-adolescência. O estabelecimento de uma imunidade mais rápida para o *P. vivax* pode ser atribuída a formação de hipnozoítos no ciclo pré-eritrocítico que pode gerar um *booster* na resposta imune, além da possibilidade de contato com diferentes variantes desse parasito, já que a infecção pode ser multiclonal (CHEN et al., 2007; MUELLER et al., 2013; WHITE, 2011); além disso, a grande dependência da proteína DBP para a invasão das células vermelhas (ADAMS et al., 1992), pode tornar a resposta de anticorpos bloqueadores ao *P. vivax* direcionada e eficiente. Porém, pouco se sabe sobre a via de aquisição e manutenção de anticorpos funcionais e protetores na malária e quais são os fatores necessários para o desenvolvimento das células B de memória (MBCs) específicas que vão produzir anticorpos protetores de longa-duração.

O conhecimento de que indivíduos naturalmente expostos a malária são capazes de produzir anticorpos contra antígenos de diferentes fases do ciclo biológico torna possível a busca pelo desenvolvimento de uma vacina eficaz que possa atuar tanto na fase pré-eritrocítica, quando na fase sanguínea (DE et al., 2021). Em estágios iniciais da infecção, os anticorpos IgG podem bloquear a migração dos esporozoítos da derme até a invasão dos hepatócitos (HOLLINGDALE et al., 1984; NARDIN et al., 1999). Durante a fase sanguínea, os anticorpos podem atuar diretamente no bloqueio das vias de invasão, inibindo o desenvolvimento dos merozoítos ou à adesão de eritrócitos infectados no epitélio (COHEN; BUTCHER; CRANDALL, 1969; MOORMANN; NIXON; FORCONI, 2019; O'DONNELL et al., 2001) ou pela destruição dos merozoítos via opsonização que facilitam a fagocitose por macrófagos, ativação da cascata do sistema complemento e/ou pela citotoxicidade celular mediada por anticorpos (BOYLE et al., 2015).

De modo geral, a grande maioria dos estudos de avaliam a resposta de anticorpos protetores em malária disponíveis na literatura focam em anticorpos da cadeia de imunoglobulina G (IgG), principalmente pelo seu papel relacionado a memória imunológica e atuação frente uma re-exposição (COICO; SUNSHINE, 2009; FOWKES; BOEUF; BEESON, 2016; LONGLEY; SATTABONGKOT; MUELLER, 2016). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a imunoglobulina do tipo M (IgM) pode ter na malária um papel subestimado. Arama e colaboradores (2015) ao comparar duas populações distintas do Oeste Africano, uma susceptível e outra resistente à infecção por *P. falciparum*, constatou que a população resistente à infecção apresentou maior magnitude de IgM na circulação. Boyle e colaboradores (2019),

ao realizar um estudo de acompanhamento na Papua Nova Guiné (PNG), mostrou que crianças que possuíam níveis elevados de IgM no plasma apresentaram um menor risco de terem malária clínica. Além disso, nosso grupo demonstrou que níveis de anticorpos IgM foram estáveis por até 9 anos em uma população da Amazônia com longa-exposição à malária (MEDEIROS et al., 2020). Esses resultados reforçam a necessidade de entender o papel de anticorpos IgM antígeno-específicos na imunidade protetora a malária.

Dessa forma, os dados da literatura evidenciam que a resposta imune adquirida à malária ocorre de forma complexa e a necessidade de mais estudos. Vale ressaltar a escassez de estudos voltados para a espécie *P. vivax*, espécie mais prevalente fora do continente Africano, o que dificulta o desenvolvimento de estratégias de controle eficiente e desenvolvimento de uma vacina eficaz contra esse parasito (MUELLER et al., 2013; MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015).

### **1.3.1. Resposta de anticorpos contra proteínas de estágios sanguíneos de *P. vivax* candidatas à vacina**

A imunidade protetora contra malária causada pelo *P. vivax* tem sido associada a anticorpos neutralizantes contra proteínas de estágios sanguíneos, que atuam inibindo a invasão do parasito na célula hospedeira, e conseqüentemente, reduzindo os sintomas clínicos da doença (CERAVOLO et al., 2008, 2009; KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016). Isto sugere que o desenvolvimento de uma vacina contra proteínas de fase sanguínea de *P. vivax* é uma estratégia viável, que pode contribuir para os programas de controle e eliminação da malária por esse parasito (MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015; THAM; BEESON; RAYNER, 2017).

No momento, a maioria dos estudos de desenvolvimento de uma vacina para contra *P. vivax*, encontram-se em estágios iniciais (BENNETT et al., 2016; MALKIN et al., 2005; SINGH et al., 2018) e somente duas vacinas baseada na DBPII está em fase I de teste clínico de vacina em humanos (PAYNE et al., 2017; SINGH et al., 2018). O primeiro se baseia em vetores virais carreando a *dbpII* que mostrou que todos os 23 indivíduos vacinados foram capazes de produzir anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC contra variantes homólogas e heterólogas, além de indução de resposta de células T e B (PAYNE et al., 2017). O segundo, utiliza-se de DBPII recombinante emulsificado ao adjuvante lipídico glicopiranosil

(GLA-SE), que induziu anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (*Binding Inhibitory Antibodies* - BIABs) para diferentes variantes, cujos níveis aumentou forma gradativa após três doses (SINGH et al., 2018). As duas formulações envolvem a cepa referência Salvador-I (Sal-1) e com o uso de adjuvantes foi possível induzir anticorpos bloqueadores com capacidade de inibir diferentes variantes. Contudo, a capacidade de inibição dos BIABs foi de apenas 50%.

A seguir, além da DBPII serão pontuados os outros candidatos à vacina de *P. vivax*, como por exemplo a DEKnull-2, EBP2 e a MSP1-19 que serão abordadas em nosso trabalho.

### **1.3.1.1 Duffy Binding Protein (DBP) de P. vivax**

A DBPII é a única proteína conhecida até o momento utilizada pelos merozoítos de *P. vivax* para estabelecer a infecção nos reticulócitos humanos (ADAMS et al., 1990, 1992). A sua importância é reforçada pelo fato de que indivíduos DARC negativos - que não expressam o receptor na superfície dos reticulócitos - são naturalmente resistentes à infecção por *P. vivax* (MILLER et al., 1976), embora casos de infecção pelo *P. vivax* em indivíduos DARC negativos tenham sido descritos (AMON et al., 2006; CAVASINI et al., 2007; GUNALAN et al., 2016; MENARD et al., 2010).

A DBP é uma proteína pertencente à família *Duffy binding-like erythrocyte-binding protein* (DBL-EBP), com aproximadamente 140kDa, localizada no micronema do parasito, possuindo 6 regiões (I-VI), estando o domínio de ligação da proteína com o receptor DARC localizado na região II. A região II da DBP (DBPII) é composta por 330 aminoácidos (aa) caracterizado por um domínio de 12 resíduos de cisteína conservados (CHITNIS; MILLER, 1994), sendo ainda subdividida em 3 regiões, conhecidas como subdomínios (SD) 1, 2 e 3, sendo o SD2 o principal envolvido na ligação com o receptor DARC (SINGH et al., 2006).

Devido à sua importância, estudos de resposta imune humoral em diversas populações, de diferentes regiões geográficas e níveis de transmissão da malária, inclusive no Brasil, tem sido realizados (DE SOUSA et al., 2014; FOWKES; BOEUF; BEESON, 2016; KANO et al., 2012; KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016; SOUZA-SILVA et al., 2014). Nessas regiões, a DBP se mostrou naturalmente imunogênica tendo a frequência de respondedores variado de 40% a 80% entre as populações estudadas, sendo a resposta a essa proteína proporcional ao

tempo de exposição ao parasito, idade e o número de episódios prévios de malária (COLE-TOBIAN et al., 2002; KANO et al., 2012; KING et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2010). Além disso, parte dos anticorpos produzidos contra a DBPII mostraram alta capacidade de inibir a interação com o seu receptor DARC (BIAbs, do inglês *Binding Inhibitory Antibodies*), impedindo a invasão dos reticulócitos pelos merozoítos sendo associada com a proteção clínica contra a doença (KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016).

Apesar da importância da DBPII e os resultados promissores, o seu uso como candidata à vacina apresenta algumas limitações como baixa imunogenicidade, mesmo em regiões de alta endemicidade, como nos países do Sudeste Asiático (COLE-TOBIAN et al., 2009), alto polimorfismo na região do ligante (TSUBOI et al., 1994); indução de anticorpos alelo-específicos (CERAVOLO et al., 2009). Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a mostrar que os BIAbs da interação DBPII-DARC são alelo-específicos (CERAVOLO et al., 2009). Neste estudo, indivíduos expostos a um surto de malária pelo *P. vivax* ocorrido em Minas Gerais - região não endêmica para malária – desenvolveram BIAbs contra a DBPII com capacidade de bloquear apenas a interação DBP-DARC da variante homóloga (CERAVOLO et al., 2009). Posteriormente, outros estudos encontraram resultados semelhantes, reforçando que a resposta de BIAbs é alelo específica (CHOOTONG et al., 2012; COLE-TOBIAN et al., 2009). Além disso, um estudo sobre a variabilidade genética da DBPII mostrou alta diversidade entre os isolados de *P. vivax* circulantes em diferentes regiões geográficas, sugerindo que, pelo menos, sete variantes deveriam ser incluídas na vacina contra *P. vivax* para atingir uma cobertura de 60% (NÓBREGA DE SOUSA; CARVALHO; ALVES DE BRITO, 2011).

Apesar dessas limitações, alguns indivíduos são capazes de produzir BIAbs contra a DBPII com ampla reatividade associados com proteção clínica (KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016). Para compreender quais os fatores podem influenciar na aquisição, persistência e amplitude da resposta de BIAbs estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar fatores do hospedeiro e epidemiológicos (CARIAS et al., 2019; KANO et al., 2016). A influência de polimorfismo de alelos de HLA de classe II na aquisição e persistência de BIAbs contra a DBPII foi avaliada em um estudo de coorte aberta que incluiu 336 indivíduos de um assentamento agrícola do interior do Amazonas pelo nosso grupo de pesquisa, onde os alelos DRB1\*07:01, DQA1\*02:01 e DQB1\*02:02 foram associados com a presença e persistência de BIAbs (KANO et al., 2016). A influência de fatores epidemiológico como longa exposição à malária tem sido associada com a aquisição de anticorpos com alta capacidade bloqueadora para

diferentes isolados (CARIAS et al., 2019; NICOLETE et al., 2016). Nesse sentido, para entender como os indivíduos expostos ao *P. vivax* e imunes desenvolvem BIAbs, um grupo avaliou a partir do isolamento de uma única célula B de memória (MBC) IgG<sup>+</sup> de indivíduos com altos níveis de BIAbs para diferentes isolados, produziram um painel de anticorpos monoclonais humanos (humMAbs) (CARIAS et al., 2019), onde verificou-se que a região codificadora para o humMAbs com capacidade bloqueadora acumula mais pontos de mutação hipersomática (20 mutações) quando comparados com humMAbs sem capacidade bloqueadora (6 mutações) (CARIAS et al., 2019).

### ***1.3.1.2 Imunógeno sintético baseada na DBPII (DEKnull2)***

No sentido de contornar o alto polimorfismo na região II da DBPII, imunógenos sintéticos com substituições da região polimórfica foram produzidos. Com base na identificação do epítipo dominante de células B altamente polimórfico (CHOOTONG et al., 2010), a primeira geração do imunógeno sintético baseado na DBPII foi construído a partir da mutação deste epítipo (DEKAQRRKQ), o qual foi denominado de DEKnull. Esta proteína foi imunogênica em modelo murinho e capaz de induzir anticorpos com capacidade bloqueadora da interação DBPII-DARC parcial contra diferentes isolados (NTUMNGIA; ADAMS, 2012). No entanto, os níveis de anticorpos bloqueadores contra DEKnull foram inferiores quando comparado a cepa referência Sal-1 (NTUMNGIA; ADAMS, 2012).

A segunda geração denominada de DEKnull-2, foi construída com base na alteração dos resíduos polimórficos não conformacionais ao longo de toda a região II da DBPII (NTUMNGIA et al., 2017). A DEKnull-2 mostrou-se imunogênica em modelo murinho, e induziu altos títulos de BIAbs a diferentes isolados. Além disso, DEKnull-2 apresentou elevada reatividade em soros de indivíduos naturalmente expostos à malária da Amazônia brasileira (NTUMNGIA et al., 2017). Ainda mostramos que a resposta de anticorpos contra DEKnull-2 (variante transcendente) foi estável ao longo de 9 anos de acompanhamento que incluiu períodos de baixa de transmissão de malária, diferentemente da resposta de anticorpos contra variante DBPII Sal-1 (variante específica) que oscilou no mesmo período (MEDEIROS et al., 2020; PIRES et al., 2018). Importante ressaltar, que anticorpos IgG contra a DEKnull-2, mas não IgM, foram associados com a resposta de BIAbs estáveis (MEDEIROS et al., 2020). Esses resultados reforçam o potencial da DEKnull-2, que se fundamenta no direcionamento da resposta imune contra os epítipos conservados, como candidato vacinal baseado na DBPII



capaz de induzir uma resposta imune variante-transcendente. Dessa forma, com base nos resultados faz-se necessário ampliar os estudos em outras populações e conhecer os mecanismos celulares envolvidos na produção de anticorpos BIAbs de amplo espectro e assim, aprimorá-la como candidato vacinal contra malária causada pelo *P. vivax*.

### ***1.3.1.3 Erythrocyte Binding Protein (EBP) de P. vivax***

A *Erythrocyte Binding Protein* (EBP) é uma proteína integrante da família *Erythrocyte binding-like* (EBL) identificada recentemente no isolado do Camboja (C127), não identificada anteriormente na cepa referência Salvador-1 (HESTER et al., 2013). Esta proteína compartilha características importantes dos membros da família EBL, incluindo o domínio *Duffy-binding like* (DBL) ou região II, essencial para a invasão dos merozoítos aos eritrócitos (ADAMS et al., 1992).

Na tentativa de validar a EBP2 como um ligante de reticulócitos e investigar se esta proteína está envolvida numa via alternativa do processo de invasão do *P. vivax* aos reticulócitos, principalmente em indivíduos *Duffy* negativos infectados (POPOVICI; ROESCH; ROUGERON, 2020), verificou-se que a EBP2 se liga preferencialmente a reticulócitos imaturos (CD71<sup>high</sup>) e *Duffy* positivos, tendo pouca ligação aos reticulócitos *Duffy* negativos (NTUMNGIA et al., 2016). Além disso, o estudo mostrou que a EBP2 é antigenicamente distinta da DBPII já que anticorpos anti-DBPII não foram capazes de inibir a ligação da EBP2 em reticulócitos (NTUMNGIA et al., 2016). Com base nesses resultados, sugere-se que EBP2 pode sim estar envolvida em uma via de invasão alternativa do *P. vivax* em indivíduos *Duffy* positivos.

Apesar de escassos, os estudos sobre a imunidade naturalmente adquirida à EBP2 apontam essa proteína como potencial candidato vacinal (FRANÇA et al., 2017; HE et al., 2019). Na tentativa de identificar combinações de proteínas para o desenvolvimento de uma vacina que confira proteção clínica, um painel composto por 38 antígenos foi avaliado em soros de crianças da PNG (FRANÇA et al., 2017). O estudo mostrou que altos títulos de combinação de anticorpos contra alguns antígenos de *P. vivax* foram associados com potencial efeito protetor (PEP), tendo a combinação de cinco antígenos, que incluem EBP2 e DBPII, conferindo PEP maior que 90% (FRANÇA et al., 2017). Na mesma direção, a combinação de anticorpos contra EBP2 e DBPII mostraram efeito protetor na redução da malária clínica em até 70% (HE

et al., 2019). Além disso, a resposta de anticorpos anti-EBP2 aumentou positivamente com idade e acúmulo de exposição à malária (HE et al., 2019). A associação entre exposição e aquisição de anticorpos contra a EBP2 também foi observada em primatas não humanos (PNH) de vida livre que apresentaram maiores frequência e níveis de anticorpos anti-EBP2 quando comparados com PNH de cativeiro (ASSIS et al., 2021).

Um único estudo sobre a variabilidade genética do gene que codifica a região II da EBP de isolados restritos aos países asiáticos identificou elevado grau de polimorfismo da EBP2 (HAN et al., 2020). Em função da baixa frequência da resposta de anticorpos contra EBP2 (16%), sugeriu-se que a baixa imunogenicidade poderia ser atribuída à alta variabilidade dessa proteína (HAN et al., 2020). Mais estudos em outras regiões geográficas são necessários para avaliar o potencial da EBP2 como candidato vacinal.

#### ***1.3.1.4 Proteína de Superfície do Merozoíto (MSP1-19) de P. vivax***

Uma das proteínas mais estudadas contra o *P. vivax* tem sido a MSP1, especialmente o fragmento C-terminal de 19kD da proteína principal de superfície do merozoíto 1 (MSP1-19) (BEESON et al., 2019; CHAN; FOWKES; BEESON, 2014). O fragmento C-terminal de 19kDa da MSP1 é produzido após sucessivas clivagens da proteína principal durante o processo de invasão do merozoíto aos reticulócitos dando origem a MSP1-19 (PARK et al., 2001; SOARES et al., 1997), conservada entre os isolados e altamente imunogênica. Esta proteína é capaz de induzir a resposta de anticorpos e MBCs de longa duração, permanecendo na concentração sérica por décadas (WIPASA et al., 2010; Hafalla et al., 2011). Corroborando com esse achado, outros trabalhos também já evidenciaram a longevidade da resposta de anticorpos contra MSP1-19 após longos períodos na ausência de exposição ao parasito (BRAGA; FONTES; KRETTLI, 1998; LIM et al., 2004). Porém, poucos estudos mostram a capacidade protetora dos anticorpos contra a MSP1-19 (VERSIANI et al., 2013).

#### ***1.3.2 Células B de memória na malária***

O desenvolvimento de vacinas eficazes depende principalmente do conhecimento sobre as vias de ativação e produção de anticorpos de longa duração. Os linfócitos B (LB) são as células do sistema imune responsáveis pela produção dos anticorpos e por esse motivo constituem um dos

principais alvos dos estudos para o entendimento da resposta imune naturalmente adquirida contra patógenos (INOUE; SHINNAKASU; KUROSAKI, 2022).

De forma geral, o desenvolvimento da cascata de eventos que culmina na produção de anticorpos e células B de memória (MBCs) tem início quando o antígeno proteico é reconhecido por células dendríticas (DC) que expressam em sua superfície altos níveis da molécula do complexo maior de histocompatibilidade II (*major histocompatibility complex* – MHC II) responsáveis por processar e apresentar o antígeno as células T específicas (NEEFJES et al., 2011). Uma vez processado pelas DCs, o antígeno será apresentado a células T CD4<sup>+</sup> *naive* através da ligação do MHC de classe II ao receptor de células T (TCR). Além da ligação MHC:TCR outras vias de sinalização coestimulatórias serão ativadas e outras moléculas de superfície (principalmente pertencentes a família CD28 e TNF/TNFR) e citocinas (importantes no processo de diferenciação dos subtipos celulares) serão recrutadas (CURTSINGER; MESCHER, 2010; WILLIAMS; BEVAN, 2007). A ativação das células T CD4<sup>+</sup> culminará em uma extensa expansão clonal que dará origem a diferentes subtipos celulares importantes na resposta imune, incluindo as células T *helper* foliculares (Tfh), importantes na ativação dos LB (SWAIN; MCKINSTRY; STRUTT, 2012).

A resposta dos LB pode ocorrer em duas vias; na primeira delas o encontro direto com o antígeno leva a uma ativação e extensiva proliferação dos LB resultando na produção de anticorpos de baixa afinidade, geralmente do tipo IgM, produzidos por células plasmáticas de curta duração (*Short Lived Plasma Cells* - SLPCs). A ativação dessa primeira via ocorre na tentativa de conter a infecção de forma rápida (PÉREZ-MAZLIAH et al., 2020). A segunda via, é dependente de interações mais complexas e produzirá uma resposta de anticorpos de maior afinidade e especificidade, geralmente do tipo IgG, que pode ser capaz de durar por anos. A especificidade da resposta dos LB depende principalmente do domínio variável do receptor de células B (BCR), onde através do BCR o antígeno será reconhecido e a célula receberá seu primeiro sinal para ativação. Após o reconhecimento do antígeno pelo BCR, os LB necessitam de um segundo sinal para serem ativados (BRETSCHER; COHN, 1970) que, geralmente é fornecido pelas células Tfh nos centros germinativos (CG), formados nos órgãos linfoides secundários. A principal ligação LB:Tfh ocorrerá através da interação da molécula de superfície CD40 com seu receptor CD40L que ativará a proliferação dos LB, maturação de afinidade dos anticorpos, recombinação e troca de classe das cadeias de imunoglobulinas (Ig) (MACLENNAN, 1994). Além da ativação através de receptores específicos as citocinas

também são importantes no processo de expansão clonal dos LB e produção de anticorpos. Nesse processo ganham especial atenção as citocinas IL-6 e IL-21 que promovem a proliferação dos LB, diferenciação em plasmoblastos e secreção de anticorpos (KARNOWSKI et al., 2012).

As reações ocorridas no CG culminarão na produção de plasmoblastos, podendo ser encontrados na circulação como células plasmáticas secretoras de anticorpos que não expressam CD20 em sua superfície. Uma segunda fração dos plasmoblastos serão direcionados para a medula óssea onde residirão como células plasmáticas secretoras de anticorpos de longa duração (*Long Lived Plasma Cells* - LLPCs). Além das LLPCs, as células B de memória (MBCs), que expressam especificamente CD27<sup>+</sup> na sua superfície, também serão produzidas nos CGs, e permanecerão re-circulando entre o sangue e os órgãos linfóides, sendo responsáveis por uma resposta mais rápida a uma reexposição ao antígeno (CYSTER; ALLEN, 2019; DE SILVA; KLEIN, 2015; KEARNEY, 2014; TARLINTON; GOOD-JACOBSON, 2013) Encontros posteriores e subsequentes com o mesmo antígeno levarão a uma reativação das MBCs, tendo um efeito cumulativo que favorece a manutenção do *pool* dessa subpopulação, e amplia a produção, hipermutação somática e conseqüente aumento da afinidade e magnitude da resposta de anticorpos (KUROSAKI; KOMETANI; ISE, 2015).

No que diz respeito a imunologia da malária, estudos têm mostrado que as MBCs contra antígenos específicos são capazes de persistirem por anos, mesmo na ausência de reexposição ao parasito, ao contrário dos títulos de anticorpos específicos que tendem a cair a níveis indetectáveis (MIGOT et al., 2008; NDUNGU et al., 2012, 2013; WIPASA et al., 2010). Esses dados sugerem que a avaliação de MBCs em conjunto com os anticorpos parece ser mais apropriada na avaliação da resposta imune adquirida à malária (NDUNGU et al., 2013). No entanto, pouco se sabe sobre o desenvolvimento, manutenção e regulação das MBCs e LLPCs, e quais são os componentes da imunidade adquirida perdidos na ausência de reexposição ao parasito da malária (LANGHORNE et al., 2008), dados importantes e fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

Nos últimos anos um número crescente de trabalhos tem sido realizado na tentativa de desvendar os mecanismos de regulação da resposta imune humoral na malária (ANTONELLI et al., 2020; HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011; PORTUGAL et al., 2017; SOARES et al., 2017; STRUIK; RILEY, 2004). Nesse contexto, trabalhos recentes têm mostrado que a exposição crônica a malária proporciona um microambiente inflamatório que

leva a redução funcional de LT e LB que atuam no controle da infecção (YAP; HUSTIN; SAUERWEIN, 2019).

Em relação aos LT, um trabalho conduzido com crianças Africanas no Mali expostas ao *P. falciparum*, mostrou uma polarização para uma resposta de LTfh funcionalmente comprometida, com perfil Th1, marcada pela elevada produção das citocinas IFN-gama, TNF além da presença do fator de transcrição T-bet, combinação que parece não favorecer a produção de anticorpos (OBENG-ADJEI et al., 2015). Isso porque, embora o perfil Th1 contribua para o controle da patologia causada pela infecção malárica, também pode limitar o desenvolvimento de uma resposta de MBCs de longa duração (YAP; HUSTIN; SAUERWEIN, 2019). Em relação ao *P. vivax*, adultos residentes em área endêmica brasileira tiveram aumento na frequência de LTfh circulantes, contribuindo para a produção de anticorpos específicos contra antígenos de fase sanguínea, através da produção da citocina IL-21 favorecido pelo acúmulo de exposição ao *P. vivax* (FIGUEIREDO et al., 2017). A diferença de aquisição de resposta imune contra malária entre os dois estudos citados anteriormente pode ser atribuídos por ter sido realizado com diferentes espécies de *Plasmodium* spp e faixa etária (crianças x adultos). Estudos prévios já mostraram que adultos parecem produzir com mais facilidade anticorpos de longa duração comparados a crianças (AKPOGHENETA et al., 2008; WHITE et al., 2014).

No que se refere aos LB na malária, estudos recentes tem mostrado que a exposição ao parasito induz a expansão de uma subpopulação de MBCs, conhecida como MBCs atípicas, tanto em indivíduos naturalmente expostos em área endêmica, (FIGUEIREDO et al., 2017; ILLINGWORTH et al., 2013; MUELLENBECK et al., 2013; PORTUGAL et al., 2012; WEISS et al., 2009, 2011) quanto em infecção malárica humana controlada (SCHOLZEN et al., 2014). Essa subpopulação apresenta características singulares como ausência de expressão dos receptores clássicos de MBCs, como CD27 e CD21 (CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>), redução da sinalização via BCR devido à alta expressão de receptores inibitórios, como FcRL5 e FcRL3 (PORTUGAL et al., 2015; SULLIVAN et al., 2015), perda das funções efetoras para produção de anticorpos e citocinas, e expressão de altos níveis do fator de transcrição T-bet, importante para o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 (OBENG-ADJEI et al., 2017).

MBCs fenotipicamente semelhantes as MBCs atípicas (CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>) na malária já foram descritas em outras doenças como hepatite C e HIV (CHARLES et al., 2008; MOIR et

al., 2008) e em indivíduos de idade avançada (RUBTSOVA et al., 2015), onde foi correlacionada com doenças auto-imunes (RUBTSOVA et al., 2017). Apesar das características semelhantes entre as MBCs atípicas em diferentes infecções, as funções parecem ser distintas. Em infecções ativas pelo HIV as células CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> possuem características hipo-responsivas ou de “exaustão”, onde essas células parecem contribuir para uma deficiência no desenvolvimento de anticorpos contra o vírus (MOIR et al., 2008). Contudo, o mesmo perfil ainda não foi confirmado para indivíduos expostos a malária (HOLLA et al., 2019).

Os trabalhos em malária mostraram uma correlação positiva entre as MBCs atípicas, acúmulo de episódios prévios e idade (WEISS et al., 2009, 2011), sugerindo que a expansão dessas células está intrinsicamente relacionada à contínua exposição ao parasito (ILLINGWORTH et al., 2013; PORTUGAL et al., 2012; SULLIVAN et al., 2015). De fato, uma maior frequência dessas células foi observada em crianças assintomáticas quando comparado com aquelas que não apresentaram infecção (WEISS et al., 2009). Além disso, foi observado que a frequência de MBCs atípicas reduziu concomitantemente a queda da parasitemia nos indivíduos ao longo da infecção (SULLIVAN et al., 2015).

Análises do perfil de imunoglobulinas expressos pelas MBCs atípicas de indivíduos expostos a malária, mostraram que essa subpopulação pode estar associada com a deficiência no estabelecimento e manutenção da resposta imune adquirida nessa doença. Especificamente, observou-se que a expressão de imunoglobulinas do tipo G (IgG) nas MBCs atípicas é mais baixa comparado as MBCs clássicas (PORTUGAL et al., 2015; SULLIVAN et al., 2015). Além disso a estimulação *in vitro* de MBCs atípicas mostrou uma reduzida taxa de proliferação, produção de citocinas, secreção de anticorpos e pouca diferenciação para células secretoras de anticorpos (ASCs), quando comparadas com as MBCs clássicas (PORTUGAL et al., 2015). Vale ressaltar também que, resultados anteriores mostram que MBCs atípicas e clássicas são dependentes de estímulos diferentes para se diferenciarem. Enquanto MBCs atípicas são ativadas na presença de IL-2, IL-10 e CD40L, as MBCs clássicas podem ser ativadas através de estímulo do BCR (EHRHARDT et al., 2005).

Em contrapartida, a análise do repertório dos genes expressos das MBCs clássicas e atípicas mostrou que essas subpopulações são consideravelmente semelhantes, podendo ter precursores em comum. Inclusive, foi observado em ambas subpopulações genes que codificam para anticorpos neutralizantes contra antígenos de fase sanguínea de *P. falciparum*

(MUELLENBECK et al., 2013; ZINÖCKER et al., 2015). No entanto, a secreção desses anticorpos não foi diretamente demonstrada nesses trabalhos. Esses resultados mostram que o papel das MBCs atípicas na malária ainda é controverso.

Interessantemente, um trabalho recente associou a alta frequência de MBCs atípicas (FcRL5<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>) a produção de anticorpos anti-fosfatidilserina responsáveis por causar anemia em pacientes expostos ao *P. falciparum* (RIVERA-CORREA et al., 2019). Nesse trabalho, os autores mostraram a produção direta desses anticorpos pelas MBCs atípicas através de cultivo *in-vitro* de células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos *naive* com lisado de eritrócitos infectados com *P. falciparum* (RIVERA-CORREA et al., 2019). Resultados semelhantes já haviam sido anteriormente observados pelo grupo em modelo murino (RIVERA-CORREA et al., 2017). Em conjunto, os dados até aqui expostos mostram que as MBCs atípicas são produzidas e mantidas na presença de exposição contínua a malária, e que essas células possuem um papel efetor na resposta imune contra a doença, contudo mais estudos se fazem necessários para elucidar a sua real contribuição.

Além da presença das MBCs atípicas, nos últimos anos, a literatura tem mostrado que as subpopulações de MBCs são mais diversas, auxiliado por novas metodologias como análise de transcriptoma de células únicas e a citometria de massa (CyTOF), possibilitado o conhecimento da expressão de diferentes classes de anticorpos na sua superfície da MBCs (NIELSEN; BOYD, 2019; REYNAUD et al., 2012). Em sua maioria, os estudos anteriores focavam em MBCs que expressam IgG na superfície (MBCs IgG<sup>+</sup>), contudo estudos relacionados com anticorpos IgM e MBCs que expressam IgM (MBCs IgM<sup>+</sup>) em sua superfície vem ganhando destaque. De forma geral, verificou-se que MBCs IgG<sup>+</sup> preferencialmente se diferenciam em células plasmáticas após reexposição ao antígeno, enquanto MBCs IgM<sup>+</sup> são responsáveis pela reativação e manutenção do *pool* de MBCs nos CG (DOGAN et al., 2009; PAPE et al., 2011). No caso de infecção murina pelo *Plasmodium chabaudi*, MBCs IgM<sup>+</sup> de camundongos infectados apresentaram quantidade de hipermutação somática nas cadeias V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> do BCR semelhante às MBCs IgG<sup>+</sup>, sendo capazes de produzir anticorpos de alta afinidade contra a proteína MSP1-19, com uma resposta mais rápida a uma reexposição (KRISHNAMURTY et al., 2016). Entretanto, estudos em humanos relacionados às MBCs IgM<sup>+</sup> são escassos e requerem estudos para avaliar a real contribuição na infecção malárica.

Diante do exposto fica evidente a presença de lacunas no entendimento da aquisição e manutenção das células envolvidas na geração de anticorpos protetores na malária. Além disso, a maioria dos estudos realizados tem sido voltados para a espécie *P. falciparum*, reforçando a necessidade de estudos que contemplem o conhecimento da resposta de LB contra *P. vivax*.

Até o momento, poucos trabalhos avaliaram a longevidade de MBCs e anticorpos específicos contra proteínas do *P. vivax* (CHANGROB et al., 2018; KOCHAYOO et al., 2019a, 2019b; WIPASA et al., 2010). Em seu trabalho, Wipasa e colaboradores (2010) avaliaram a resposta de anticorpos e MBCs específicas para PvMSP-19 e PvAMA-1 em indivíduos que tiveram o último episódio de malária seis anos antes do início do estudo. Após esse período na ausência de episódios de malária, foi possível detectar MBCs circulantes específicas para PvMSP1-19 e PvAMA-1. No que se refere à DBPII, Changrob e colaboradores (2018) a duração dos níveis de anticorpos específicos à diferentes variante predominante na Tailândia foi de até 9 meses do último episódio de malária, enquanto que MBCs foram detectadas até 3 anos. Nenhum dos estudos mostrou correlação da resposta de anticorpos e a presença de MBCs.



## 2 JUSTIFICATIVA

Dentre as espécies responsáveis pelos casos de malária registrados no mundo, *P. vivax* é o que possui a maior distribuição global, sendo responsável pela maioria dos casos registrados fora da África (WHO, 2021). Evidências de resistência do *P. vivax* às drogas atualmente disponíveis, bem como o aumento de morbidade e mortalidade atribuídos ao potencial de recidivas desse parasito (ANSTEY et al., 2009; FERREIRA et al., 2021; GENTON et al., 2008; IMWONG et al., 2007; POPOVICI et al., 2018; TJITRA et al., 2008) preocupam e reforçam a necessidade de se desenvolver uma vacina que possa contribuir no controle dessa doença. No entanto, a busca por uma vacina eficaz contra esse parasito apresenta limitações dada a complexidade biológica dessa espécie (MUELLER et al., 2013). Para o desenvolvimento de uma vacina eficaz é necessário entender os requisitos e os mecanismos de desenvolvimento da resposta imune protetora contra os antígenos alvos, bem como sua duração.

Até o momento, a proteína DBPII tem se mostrado o alvo mais promissor para o desenvolvimento de uma vacina de fase sanguínea contra o *P. vivax* (PAYNE et al., 2017; SINGH et al., 2018), devido a sua importância para garantir o parasitismo em eritrócitos, via interação com o antígeno *Duffy* receptor para quimiocinas DARC expresso na superfície dos reticulócitos (ADAMS et al., 1990, 1992). Além disso, já foi demonstrado que alguns indivíduos são capazes de produzir anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs), onde altos níveis de BIAbs foram associados com proteção clínica contra a doença (KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016). Contudo, a extensa diversidade na região do ligante da DBP (região II- DBPII) representa um desafio para o desenvolvimento de uma vacina baseada nesta proteína (COLE-TOBIAN; KING, 2003; SOUSA et al., 2010; TSUBOI et al., 1994). No intuito de contornar o alto polimorfismo, um imunógeno sintético foi construído baseado na deleção das regiões polimórficas da região II da DBP, denominado DEKnull-2. Este antígeno mostrou resultados promissores, onde foi capaz de induzir anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC contra diferentes isolados (NTUMNGIA et al., 2017). Além disso, a resposta de anticorpos IgG contra a DEKnull-2 foi associado aos anticorpos bloqueadores da interação sendo estáveis por até 9 anos, incluindo período de baixa transmissão (MEDEIROS et al., 2020).

Os estudos mais recentes têm apontado que a combinação de múltiplos antígenos, aumenta a eficácia de uma vacina, uma vez que o processo de invasão de reticulócitos pelos

merozoítos requer uma série de interações sequenciais para estabelecer a infecção (BOURGARD et al., 2018; MUELLER et al., 2013). Nesse sentido, dois importantes estudos mostraram que a combinação entre DBPII e EBP2 foram associados com redução dos casos malária pelo *P. vivax* (França et al., 2017; He et al., 2009). No entanto, essa associação foi observada apenas para a variante predominante do sudeste asiático, sendo necessários outros estudos.

No que diz respeito a avaliação da aquisição e duração da resposta imunológica contra antígenos de *P. vivax*, até o momento poucos trabalhos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a duração da resposta de MBCs específicas aos antígenos de *P. vivax* (CHANGROB et al., 2018; KOCHAYOO et al., 2019a, 2019b; WIPASA et al., 2010). Embora nestes estudos foram avaliados indivíduos sem histórico de malária aguda por até 6 anos, não se pode excluir exposição prévia à malária, uma vez que foram conduzidos em áreas de baixa transmissão onde as espécies *P. vivax* e *P. falciparum* coexistem. Dessa forma, avaliar a aquisição e longevidade da resposta imune aos antígenos de *P. vivax* em indivíduos expostos à uma única espécie de plasmódio e com número de infecções prévias conhecido, seria ideal para avaliar potenciais alvos vacinais e determinar o estabelecimento de memória imunológica.

Portanto, diante da possibilidade de estudar uma população exposta a um surto de malária causada pelo *P. vivax* uma única vez, ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte -MG, área não endêmica para malária, avaliamos a aquisição e a duração da resposta imune humoral contra os ligantes de invasão de reticulócitos de *P. vivax* candidato à vacina (EBP2, DBPII e o imunógeno sintético DEKnull-2), bem como a resposta de MBCs específica.

### 3 OBJETIVO

Avaliar a duração da resposta imune humoral contra proteínas de *Plasmodium vivax* envolvidas no processo de invasão de reticulócitos (EBP2, DBPII e DEKnull-2), bem como a resposta de células B de memória de longa duração em indivíduos expostos uma única vez ao *P. vivax*.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil da resposta de anticorpos IgM e IgG contra proteínas de *P. vivax* envolvidas no processo de invasão de reticulócitos (EBP2, DBPII e DEKnull-2) após curta e única exposição ao *P. vivax* por 12 meses;
- Avaliar a duração da resposta de células B de memória (MBCs) antígenos específicos após 13 anos sem reexposição ao parasito;
- Avaliar o balanço de subpopulações de células B e células plasmáticas sob estímulos com a DBPII e a DEKnull-2 após 13 anos sem reexposição ao parasito;
- Avaliar o perfil de expressão gênica relacionados à imunidade inata e adaptativa sob estímulo de antígenos de *P. vivax* após 13 anos sem reexposição ao parasito.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Surto de malária pelo *P. vivax* em área não endêmica

No período de abril a maio de 2003 foi descrito pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais e Coordenação de Gestão da Região metropolitana de Belo Horizonte, um surto de malária no distrito de Sousa (**Figura 2**), município de Rio Manso, localizado a 79 km de Belo Horizonte. Antes do surto, a doença nunca havia sido registrada na região. Na ocasião, foram identificados 25 indivíduos com malária causada por *P. vivax*. O diagnóstico foi realizado por microscopia ótica e os indivíduos tratados de acordo com o protocolo terapêutico estabelecido pelo Ministério da Saúde (CERBINO et al., 2003). O inquérito epidemiológico identificou como fonte provável do surto um morador de Sousa que retornou do município de Humaitá, no estado do Amazonas, no final de 2002 e apresentou episódios de recaídas de malária pelo *P. vivax*. A pesquisa entomológica realizada na região considerou a área como altamente receptiva a doença devido à presença do vetor *Anopheles darlingi* (CERBINO et al., 2003). Após o tratamento, todos os indivíduos foram submetidos a exame de verificação de cura onde 11 (44%) dos 25 pacientes diagnosticados apresentaram quadros de recaída (ZUMPARNO, 2004). O surto foi prontamente controlado pelo rápido tratamento adequado, acompanhamento dos doentes e pela aplicação espacial e residencial de inseticida residual Cipermetrina (CERBINO et al., 2003).

Na ocasião, o grupo de pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária do IRR/Fiocruz Minas, conduziu um estudo, do tipo longitudinal, para caracterizar a resposta imune humoral contra a DBP. O estudo do tipo caso-controle incluiu 16 dos 25 (64%) indivíduos diagnosticados com malária no momento do surto (*caso*) e 18 indivíduos que residiam no local, mas que não apresentaram doença clínica (*não-caso*). Esses indivíduos foram acompanhados por cerca de 12 meses para avaliar a duração da resposta de anticorpos contra a DBP após uma única exposição ao *P. vivax* (CERAVOLO et al., 2009).

**Figura 2. Localização das áreas de estudo.** Mapa do Brasil indicando as regiões endêmica (em verde) e não endêmica (em cinza). A região endêmica compreende a região da Amazônia legal e no mapa estão indicados a capital do Amazonas, Manaus, e o assentamento agrícola de Rio Pardo. Em laranja, destacando na região não endêmica o estado de Minas Gerais, com a capital Belo Horizonte e Região metropolitana, indicando a localização do distrito de Sousa, município onde foi registrado o surto de malária em 2003.



## 4.2 Voluntários e coleta de sangue

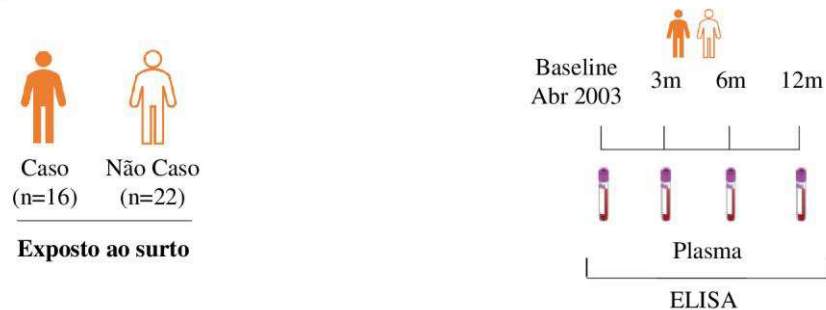
### 4.2.1 *Indivíduos primoinfectados em surto de P. vivax fora da área endêmica*

Amostras de plasma coletadas ao longo do ano de 2003 foram mantidas no biorrepositório do grupo de pesquisas de Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM) do Instituto René

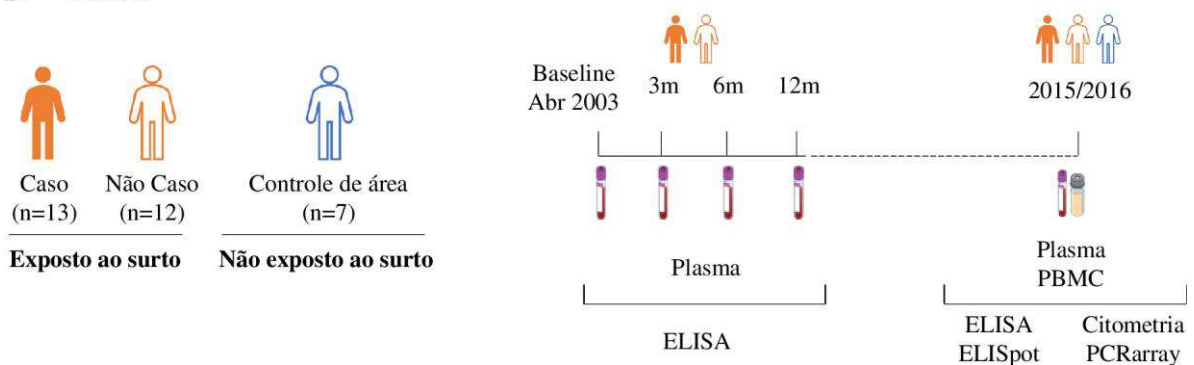
Rachou (IRR) e após o consentimento pelos voluntários, utilizadas para avaliação de resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea de *P. vivax*, como primeira parte desse estudo (**Figura 3A**). Na segunda parte desse trabalho buscamos avaliar a longevidade da resposta imune contra antígenos de *P. vivax*, e para esse propósito foi realizado uma nova coleta entre novembro de 2015 e abril de 2016, aproximadamente 13 anos após o surto de malária (**Figura 3B**). Nessa etapa, indivíduos que tiveram malária em 2003 e ainda residiam no local foram convidados a participar dessa nova etapa do estudo (Caso). Além disso, moradores expostos à infecção na época do surto e que não tiveram malária também foram convidados (Não caso). Um grupo de controle de área também foi incluído, composto por indivíduos que mudaram para o município de Sousa após o ano de 2003 e nunca visitaram área endêmica para malária até o momento da coleta (**Figura 3B**). Os critérios de inclusão no trabalho foram: (1) participação voluntária, através do consentimento livre esclarecido (TCLE); (2) não ter visitado área endêmica de malária nos últimos 13 anos; (3) apresentar idade maior ou igual a 15 anos; (4) não apresentar incapacidade física e/ou mental, (5) não ser portador de doença aguda/crônica debilitante; (6) se mulher, indicar a ausência de gravidez. Foram incluídos no estudo 13 dos 16 (81%) indivíduos previamente infectados com malária (caso) que participaram da primeira parte do trabalho (CERAVOLO et al., 2009), 12 voluntários que, embora não tenham sido diagnosticados com malária na ocasião do surto, foram expostos ao risco de transmissão (não-caso) e 7 indivíduos que passaram a residir em Sousa após o ano de ocorrência do surto (controle de área). Sangue total (cerca de 40 mL) foi coletado em tubo de vacutainer contendo heparina sódica para obtenção de plasma e células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs). Todos os participantes foram entrevistados por meio de um questionário (Anexo 1) e aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o TCLE (Anexo 2), conforme as normas vigentes para pesquisa ética envolvendo seres humanos (Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012). Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas (CAAE: 50522115.7.0000.5091).

**Figura 3. Desenho experimental do estudo.** (A) Indivíduos expostos ao surto de malária pelo *P. vivax* no distrito de Sousa, Minas Gerais, em abril de 2003, foram divididos em Caso (n=16), indivíduos que apresentaram sintomas de malária e diagnóstico positivo de malária confirmado pela microscopia; Não caso (n=22), para os indivíduos não apresentaram sintomas da doença na ocasião. (B) Para avaliação da longevidade da resposta imunológica 13 anos após o surto ter ocorrido em Sousa (Parte 2 desse trabalho), foi realizada uma nova coleta onde foi possível incluir 13 indivíduos do grupo Caso e 12 do grupo Não caso. Além disso, nessa parte do estudo, incluímos um grupo controle de área que incluiu indivíduos que não residiam em Sousa no momento do surto e nunca estiveram em área endêmica até momento da coleta realizada (n=7). Todos os grupos foram nivelados por idade. Os indivíduos Caso e Não caso tiveram amostras de plasma coletadas para avaliação sorológica, em 2003, pouco tempo após a fase aguda do surto (Baseline), 3, 6 e 12 meses após. Doze/treze anos após o surto (2015/2016) foi realizada uma nova coleta para obtenção de plasma e PBMC incluindo agora o grupo controle de área para nova avaliação sorológica além de metodologias para avaliação da resposta de MBCs.

#### A Parte 1



#### B Parte 2



#### 4.2.2 Indivíduos residentes em área de transmissão ativa de malária

Para avaliar a influência da exposição prévia a malária na aquisição da resposta de anticorpos contra as proteínas de *P. vivax*, incluímos em nossas análises amostras de plasma de indivíduos com histórico de exposição prolongada a esse parasito (mediana de idade, 17 ano, IQR 11-33) residentes em uma comunidade rural do Amazonas chamada Rio Pardo (KANO et al., 2012; SOUZA-SILVA et al., 2014), onde nosso grupo de pesquisas realiza um estudo de acompanhamento desde 2008 (Figura 2). O critério de seleção das amostras incluídas nas análises do presente trabalho foi baseado nas informações contidas no Sistema de Informação

de Vigilância Epidemiológica (SIVEP), onde, a partir desse banco de dados, selecionamos indivíduos que apresentaram um único ou múltiplos episódios de malária confirmado por microscopia ótica. O sangue para obtenção de plasma dos indivíduos foi obtido de acordo com protocolos aprovado pelo comitê de ética do IRR (Protocolo CEPESH/IRR No.007/2006, No. 07/2009 e n° 12/2010) e e são mantidas no biorrepositório do nosso grupo de pesquisas.

### **4.3 Processamento das amostras de sangue: obtenção de plasma e das células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell – PBMC*)**

Inicialmente parte do sangue total foi centrifugada 350 x g por 10 minutos para a obtenção do plasma. Uma alíquota de 500 µL de plasma foi armazenada em -20 °C para realização da sorologia. O restante do sangue foi diluído na proporção 1:1 em RPMI 1640 incompleto (24 mM bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 U/mL penicilina e 0,017 mM estreptomicina, pH 7,4). Cuidadosamente o sangue foi adicionado sobre uma solução de histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:2 e centrifugado a 350 x g por 40 min em temperatura ambiente. Após o anel formado entre a interface do plasma e histopaque (PBMCs) foi coletado e submetido a três lavagens em RPMI incompleto (350 x g por 10 min a 4°C, 3 vezes). Ao final as células foram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL em 90% de soro bovino fetal (SFB, Gibco) suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) para congelamento. Inicialmente, a suspensão de PBMCs foi mantida em câmara de congelamento (Nalgene) contendo isopropanol em -80°C por 24h. Posteriormente, foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) até o uso.

## **4.4 Proteínas recombinantes**

### **4.4.1 *Erythrocyte Binding Protein 2 (EBP2)***

A proteína recombinante EBP2 (aminoácidos 159 a 485) da sequência do isolado C127 do Camboja, foi expressa em *E. coli* como uma proteína insolúvel, com massa molecular de 37kDa ligada a uma cauda de poli-histidina (6xHis) para facilitar a purificação por cromatografia de afinidade, submetida ao processo e remodelamento, validado como previamente descrito (NTUMNGIA et al., 2016). A proteína foi produzida em colaboração com o grupo do nosso colaborador Dr. John Adams da *University of South Florida (USF)*, cujo lote da proteína foi validado.



#### **4.4.2 Duffy binding protein de P. vivax (DBPII) e imunógeno sintético baseado na DBPII (DEKnull-2)**

A região II da *Duffy binding protein* recombinante (DBPII, aminoácidos 243 a 573, 39 kDa) da variante referência Sal-1 e do Surto (Sousa), bem como a DEKnull2 foram produzidas em *E. coli*, com massa molecular de 39 kDa ligada a uma cauda de 6xHis, purificadas em resina de níquel. Em seguida, submetida ao processo de remodelamento, validado como previamente descrito (NTUMNGIA et al., 2017; NTUMNGIA; ADAMS, 2012).

#### **4.4.3 Proteína de superfície do merozoíto 1 de P. vivax (MSP1-19)**

A proteína de superfície do merozoíto 1 utilizada no estudo representa o fragmento C-terminal de 19kDa (MSP1-19, aminoácidos entre 1616 e 1704), de massa molecular de 19kDa, gentilmente cedida pela Dra. Irene Soares da Universidade de São Paulo. Os detalhes da produção da MSP1-19 foram descritos em detalhe anteriormente (CUNHA; RODRIGUES; SOARES, 2001; SOARES et al., 1999).

#### **4.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgM e IgG contra EBP2, DBPII DEKnull-2 e MSP1-19**

Os ensaios de ELISA foram realizados segundo protocolo estabelecido em nosso laboratório sendo que, a concentração dos antígenos recombinantes e diluição dos anticorpos primário e secundário foram determinadas previamente por titulação (SOUZA-SILVA et al., 2014). Resumidamente, placas de 96 poços (NUNC MaxiSorp®) foram sensibilizadas por 12 horas a 4°C com 100 µL por poço dos antígenos nas concentrações de: 1,5 µg/mL de EBP2, 3 µg/mL de DBPII (Sal-1 e isolado do Surto) e DEKnull-2 e 1 µg/mL para MSP1-19. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com solução de PBST (PBS 1x, 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 200 µL/poço da solução de bloqueio (PBST com 5% de leite em pó desnatado). Após 1 hora, as placas foram lavadas 10 vezes com a solução de PBST e incubadas a 37°C com 100 µL de plasma diluído a 1:400 e 1:100 para IgM e IgG respectivamente, em tampão PBST contendo 3% de leite em pó desnatado, em duplicata. Após a incubação, as placas foram lavadas 10 vezes e incubadas por 1 hora com 100 µL/poço do conjugado humano ligado à peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000, tanto para IgM quando para IgG, em PBST com 3% de leite em pó desnatado. Após a lavagem, a reação foi revelada com dihidrocloridrato de

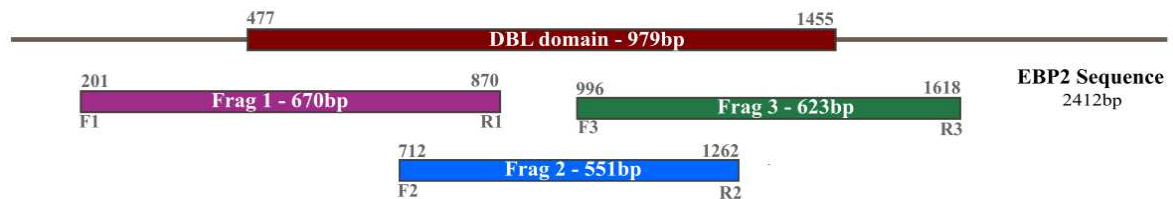
ortofenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich) diluído em 50 mL de tampão 0,1 M citrato de sódio pH 5,0 e 40 µL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck Millipore). Após 20 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 4N. A densidade ótica foi mensurada em filtro de 492nm (DO492nm) em leitor automático de ELISA (Spectra Max 340PC 384, Molecular Devices). O limite de corte (*cut-off*) entre os positivos e negativos foi estabelecido com base na média da DO de plasma de 30 indivíduos nunca expostos à malária, acrescida de dois desvios padrão. O valor obtido para DO 492nm da amostra foi dividido pelo *cut-off* para obtenção do índice de reatividade (IR). Foram considerados positivos indivíduos com IR > 1.

#### 4.6 Reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene *ebp2* do isolado do surto de *P. vivax*

Para amplificar toda a região II (domínio DBL) da EBP2, três pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados para garantir a cobertura total do domínio DBL. Os três iniciadores foram desenhados com base na sequência do isolado C127 como referência (HESTER et al., 2013), tendo o primeiro fragmento 670 pares de base (pb) (nucleotídeo 201 a 870), o segundo 551 pb (nucleotídeo 712 a 1262) e terceiro fragmento 623bp (nucleotídeo 996 a 1618) (**Figura 4**). Dessa forma, as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas para a amplificação de um fragmento compreendendo dos nucleotídeos 201 ao 1618; (aminoácidos 68-535) utilizando 3 pares de iniciadores correspondentes aos fragmentos 1 (senso – 5' AGAAATAAGAAAAAGAGCAGTAG 3' e anti-senso – 5' ATTTCCATGCGCCACGATG 3'); fragmento 2 (senso – 5' CAAGTCCTTCTTTCACTAAAC 3' e anti-senso – 5' GTATCCCATTGCTCCTTCTTTA 3'); e fragmento 3 (senso – 5' AGGTAAAGGCAAAGAAGGCA 3' e anti-senso – 5' CTCTTCCTTTACTCTTCCCA 3') desenhados no programa Oligo 6.4 (Molecular Biology Insights, Colorado, USA).

As reações de PCR foram realizadas em volumes de 20µl, utilizando 100-200ng (2uL) da amostra de DNA, 0,5µM de cada iniciador, 1,25mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (0,6uL) 0,75mM de MgCl<sub>2</sub>, (0,4uL) 1U da enzima platinum Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen, California, USA) e 2µL de tampão 10X fornecido com a enzima. As amplificações foram conduzidas em termociclador Veriti (Applied Biosystems). As condições da PCR foram um ciclo de 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 40 segundos a 95 °C, 40 segundos a 58 °C, 1:30 minuto a 72 °C, e finalmente um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72 °C

**Figura 4: Representação esquemática dos iniciadores desenhados para sequenciamento do domínio DBL da proteína EBP2 do isolado referente ao surto de Sousa.** Para sequenciamento do domínio completo foram desenhados três pares de iniciadores que amplificaram três fragmentos complementares. Cada fragmento amplificado está representado com os respectivos pares de oligonucleotídeos iniciadores senso (*Forward*) e anti-senso (*Reverse*) nas cores correspondentes, sendo: Fragmento 1 em rosa (201-870pb), Fragmento 2 em azul (posição 717-1262bp) e Fragmento 3 em verde (996-1618bp).



#### 4.7 Sequenciamento do gene *ebp2* do isolado do surto de *P. vivax*

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o sistema BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems - Life Technologies) e analisador de DNA ABI 3730xL (Applied Biosystems) baseado no método de terminação de cadeia com ddNTPs descrito por Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Nas reações de seqüenciamento foram utilizados os produtos amplificados pela PCR tratados com o sistema de purificação de PCR ExoSAP-IT (Affymetrix, USB), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, para a reação de seqüenciamento adicionou-se a cada poço de uma placa de 96 poços até 2µl de DNA (cerca de 100ng), 0,5µl dos mesmos iniciadores utilizados na PCR, e 0,5µl de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems - Life Technologies) contendo enzima, dNTPs e ddNTPs; 0,1µl do tampão 5X fornecido com o BigDye e 6,9 µl de água para um volume total de 10µl por reação. As reações foram conduzidas em termociclador Veriti (Applied Biosystems - Life Technologies) com um ciclo de 1min a 96°C, seguido por 35 ciclos de 15seg a 96°C, 15seg a 57°C, e 4 min a 60°C. O DNA foi precipitado adicionando 1µl de EDTA a 125mM, 1µl de acetato de sódio a 3M e 50µl de etanol absoluto 100%. O homogeneizado foi incubado por 15min a 25°C protegido da luz e depois centrifugado a 3700 RPM por 45 min a 25°C. O sobrenadante foi removido por inversão da placa e o sedimento lavado com 100µl de etanol 70%. Após descarte do excesso de álcool, a placa foi centrifugada a 3700 RPM por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e o restante do álcool deixado evaporar por cerca de 10min à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 10µl de tampão contendo 70% formamida e 1mM EDTA e armazenado a 4°C. Posteriormente, a placa foi analisada através de eletroforese capilar utilizando o analisador de DNA ABI 3730xL

(Applied Biosystems). Um total de 6 *reads* de cada fragmento foi usado para alinhamento e construção da sequência contig final de EBP2 no programa Bioedit (HALL, 1999). Posteriormente, essa sequência contig foi alinhada e comparada com a sequência de referência C127 (número de acesso: KC987954, HESTER et al., 2013) para identificação de possíveis polimorfismos.

#### **4.8 Cultura das PBMCs e ativação policlonal das células B de memória circulantes**

PBMCs foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e, adicionadas em tubos tipo Falcon contendo 10 mL de RPMI completo (24 mM bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 U/mL penicilina e 0,017 mM estreptomicina, 10% SBF, pH 7,4) contendo 20µg/mL de benzonase® nuclease (Sigma-Aldrich). As células foram lavadas duas vezes com RPMI completo em 300 x g por 10 minutos e contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis foram ajustadas para a concentração de  $15 \times 10^5$  células/mL em RPMI completo, adicionadas em placas de 24 poços (Costar) e incubadas por 72 horas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, acrescidas de ativadores policlonais, R848 (do grupo das imidazoquinolinas, agonista de receptor do tipo Toll 7/8 humano) (Mabtech) e Interleucina 2 (IL-2) humana recombinante (Mabtech), de acordo com Jahnmatz e colaboradores (JAHNMATZ et al., 2013). Além disso, células sem a presença dos ativadores policlonais foram incluídas como controle negativo para cada indivíduo.

#### **4.9 Ensaio imunoenzimático (ELISpot) para detecção de células B memória antígeno-específicas de *P. vivax***

O ensaio de ELISpot para detecção de células B secretoras de anticorpos do tipo IgG foi baseado no protocolo descrito por Jahnmatz e colaboradores (JAHNMATZ et al., 2013). Placas de 96 poços de nitrocelulose (MAHAS4510, Merck millipore) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IgG de captura MT91/145 (Mabtech) na concentração de 10 µg/mL para detecção das células secretoras de anticorpos (controle de funcionalidade) e DEKnull-2, 20 µg/mL para DBPII Sal-1 e MSP1-19 para detecção das células B secretoras de anticorpos antígeno-específicas. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 1X (137 mM NaCl 2,68 mM KCl, 10,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) e bloqueadas por 30 minutos com RPMI completo em temperatura ambiente.

Após 72h de estímulo policlonal, as células foram lavadas com RPMI 1640 completo e centrifugadas por 10 minutos em 350 x g, 4°C. Posteriormente, as células viáveis foram ajustadas para as concentrações de  $5 \times 10^5$  células/mL e  $20 \times 10^5$  células/mL para detecção de IgG total e de IgG antígeno-específicos, respectivamente, e 100µL foram colocados em cada poço. As células foram mantidas em 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 12-16 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS 1X para remoção das células. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo de detecção anti-IgG humano biotilado MT78/145 (Mabtech) diluído em 1 µg/mL em PBS suplementado com 0,5% SBF e foi incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Novamente, as placas foram lavadas e incubadas 1 hora em temperatura ambiente com estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (ALP) (Mabtech) diluída 1:1000. Em seguida, 100µL do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato conjugado com Nitro azul tetrazólio filtrado (BCIP/NBT, Mabtech) foram adicionados à placa e incubado em temperatura ambiente sob abrigo da luz. O substrato foi mantido até que fossem observados os spots (cerca de 30 minutos). A reação foi interrompida com água corrente e as placas mantidas no escuro.

A leitura dos *spots* foi realizada manualmente com auxílio de um microscópio estereoscópio (aumento de 10X). O número de *spots* por poço foi corrigido para um total de um milhão de PBMCs e o resultado foi expresso como número de células secretoras de IgG (IgG+ ASCs) /  $1 \times 10^6$  PBMCs. Adicionalmente, também foi calculada a porcentagem de células secretoras de IgG específicas entre o total de células secretoras de IgG.

#### **4.10 Cultura e avaliação fenotípica de subpopulações de células B**

PBMCs foram descongeladas como descrito no item 4.6. Após a lavagem as células foram ressuspendidas em 1mL em meio RPMI completo e 10 µL da suspensão foram diluídos em 90 µL do corante de viabilidade *Tripán Blue* (Gibco) para contagem em câmara de Neubauer. A concentração de PBMC viáveis foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL, distribuídas em tubos de polipropileno de 5mL (Falcon) e incubadas por 96h em estufa 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em quatro condições diferentes: (1) sem a presença de ativadores ou estímulos específicos – controle negativo; na presença de (2) ativadores policlonais, R848 e IL-2 (Mabtech) recombinante humano, na concentração final de 1µg/mL e 10 ng/mL respectivamente – como controle positivo; e (3) DBPII Sal-1 (4) DEKnull-2 na concentração de 10 µg/mL.

Após 96h uma alíquota do sobrenadante de cada cultura foi coletado para posterior análise de citocinas e o restante foi centrifugado 350 x g, 4 °C. Posteriormente as células foram ressuspensas em PBS 1X e incubadas com o marcador de viabilidade celular (*Live/Dead FixableDeadCell Stains*, Invitrogen, Califórnia, USA) por 15 minutos, conforme recomendado pelo fabricante. Após à incubação, as células foram lavadas em PBS 1X e submetidas à marcação de superfície com um painel contendo anticorpos para avaliação de subpopulações de MBCs. Os marcadores (anticorpos monoclonais), bem como os clones e respectivos fluoróforos utilizados neste painel estão descritos no Quadro 1.

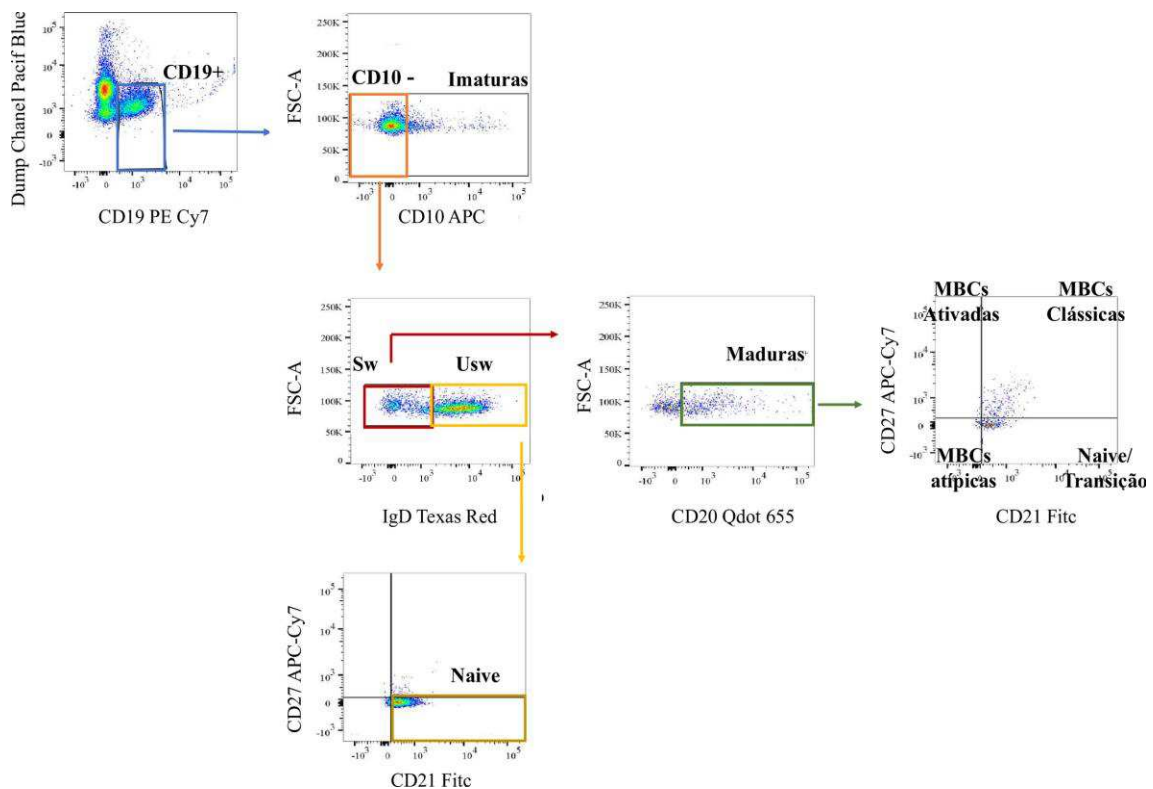
Todos os anticorpos selecionados foram previamente titulados e o volume de cada anticorpo foi ajustado dentro do painel para avaliação das subpopulações de células B. Resumidamente, os anticorpos foram diluídos em tampão de FACs (PBS 1X contendo 2% de SBF) e 100 µL do *mix* de anticorpos foram adicionados a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL de cada indivíduo. A incubação para marcação de superfície das células com os anticorpos foi realizada por 30 minutos sob proteção da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão de FACs e centrifugadas a 350 x g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em tampão FACs para aquisição no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Pharmingen), onde os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) foram utilizados para selecionar a população de linfócitos. Foram adquiridos aproximadamente 200.000 eventos de cada amostra.

#### **4.11 Estratégia de análise para definição de subpopulações de células B pela citometria de fluxo**

A estratégia de análise utilizada para obtenção das subpopulações de células B foi baseada na exclusão inicial de monócitos (CD14<sup>+</sup>), células T (CD3<sup>+</sup>) e células mortas (marcadas com corante Live/Dead) onde essas populações foram agrupadas em um único canal de leitura no citômetro (comprimento de onda violeta 450nm, eFluor450) (**Figura 5**). Posteriormente as células B totais foram identificadas através da expressão do marcador CD19<sup>+</sup>. A partir do gate de células B CD19<sup>+</sup> foram selecionadas as células B imaturas pela expressão de CD10<sup>+</sup>. As células B CD10<sup>-</sup> foram subdividas pela expressão de IgD em células B *Switched* (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>) e *Unswitched* (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>). A partir das células Unswitched, células B *naïve* foram identificadas pela expressão de CD21<sup>+</sup> e ausência expressão de CD27 (CD27<sup>-</sup>). As subpopulações de células B memória (MBC) foram obtidas a partir do *gate* de células *switched*

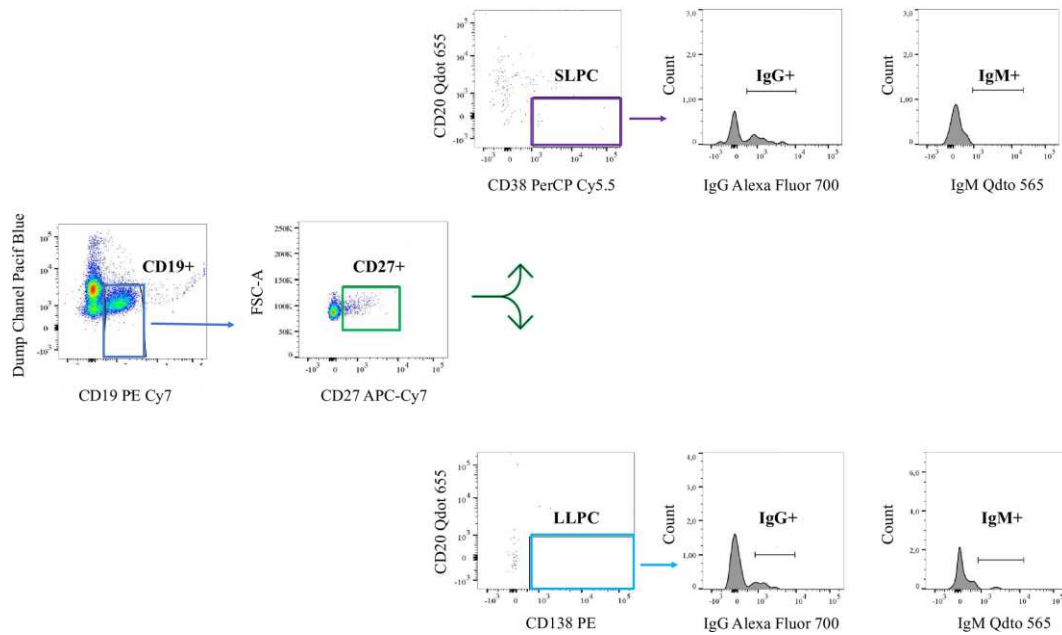
e identificadas baseada na expressão dos marcadores CD21 e CD27 em: células B de memória clássica ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^+CD21^+$ ), ativada ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^+CD21^-$ ), atípica ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^-CD21^-$ ), e células B de transição ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^-CD21^+$ ) (**Figura 5**). A expressão de IgG e IgM na superfície também foram avaliadas nas subpopulações de MBCs.

**Figura 5: Estratégia de análise por citometria de fluxo para fenotipagem de subpopulações de células B.** Monócitos ( $CD14^+$ ), células T ( $CD3^+$ ) e células mortas marcadas com corante de viabilidade celular Live/Dead foram agrupadas em um mesmo canal de exclusão. A partir do gate de células B totais ( $CD19^+$ ) foram obtidas as subpopulações de células B Imaturas ( $CD19^+CD10^+$ ); Células B Unswitched ( $CD19^+CD10^-IgD^+$ ) e Células B Naive ( $CD19^+CD10^-IgD^+CD27^-CD21^+$ ). A partir das células B Switched ( $CD19^+CD10^-IgD^-$ ) as subpopulações de células B de memória (MBCs) foram definidas da seguinte forma: MBCs ativadas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^+CD21^-$ ), MBCs clássicas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^+CD21^+$ ), MBCs atípicas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^-CD21^-$ ) e MBCs Naive/transição ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^-CD21^+$ ).



As subpopulações de células plasmáticas foram obtidas a partir do grupo de células B totais ( $CD19^+$ ) que expressam  $CD27^+$  e foram divididas em células plasmáticas de curta ( $CD20^-CD38^+$ ) e longa duração ( $CD20^-CD138^+$ ). A expressão de IgG e IgM na superfície de ambas as subpopulações também foi avaliada (**Figura 6**). Para análise dos dados foi utilizado o programa FlowJo versão 10.

**Figura 6: Estratégia de análise por citometria de fluxo para fenotipagem de subpopulações de células plasmáticas.** Monócitos ( $CD14^+$ ), células T ( $CD3^+$ ) e células mortas marcadas com corante de viabilidade celular Live/Dead foram agrupadas em um mesmo canal de exclusão utilizando o marcador Pacific Blue. A partir do gate de células B totais ( $CD19^+$ ) foram definidas as subpopulações de células plasmáticas da seguinte forma: Células plasmáticas de curta duração (SLPC, do inglês *Short Lived Plasma cells* –  $CD19^+CD27^+CD20^-CD38^+$ ) total e expressando IgG e IgM na superfície, e Células plasmáticas de longa duração (LLPC, do inglês *Long Lived Plasma cells* –  $CD19^+CD27^+CD20^-CD138^+$ ) total e expressando de IgG e IgM na sua superfície.



**Quadro 1-** Lista de anticorpos utilizados para o ensaio de citometria de fluxo

Marcador	Fluoróforo	Clone	Marca
CD14	eFluor 450	6ID3	eBioscience
CD3	eFluor 450	OKT3	eBioscience
IgM	Violet 570	MHM-88	Biologend
CD20	Qdot 655	2H7	Biologend
CD21	FITC	B-Ly4	IOtest
IgD	PE-CF594	IA6-2	BD
CD19	PE Cy7	HIB-19	BD
CD10	APC	HI10-a	BD
IgG	AlexaFluor700	GI8-145	BD
CD27	APC-Cy7	O323	BD
CD38	PercP Cy5.5	HIT2	BD
CD138	PE	MI15	BD



#### 4.12 Extração de RNA e PCR Array para análise diferencial de expressão gênica relacionada à imunidade inata e adaptativa

PBMCs foram preparadas para incubação como descrito no item 4.8. Após a lavagem e contagem as células foram distribuídas em tubos de polipropileno de 5mL (Falcon) e incubadas por 6h em estufa 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> para estabilização. Em seguida, um milhão de PBMC foram submetidas às seguintes condições por 12h: (1) apenas meio RPMI 1640 completo – controle negativo; (2) 10 µg/mL DBPII Sal-1. Em seguida, as PBMCs foram centrifugadas 400 x g por 10 minutos em temperatura ambiente, ressuspensas em 750 µL de Trizol (ThermoFisher) para posterior extração de RNA. As amostras foram armazenadas em -80 °C até o processamento.

O isolamento de RNA foi realizado em duas etapas: (1) separação da fase orgânica realizada por Trizol, de acordo com as instruções do fabricante; (2) seguida de purificação pelo *Kit NucleoSpin for RNA purification* (Machery-Nagel). O RNA obtido foi convertido em cDNA utilizando o kit *High Capacity cDNA Reversion transcription* (ThermoFisher), conforme instruções do fabricante. Para confirmar a síntese do cDNA, foi realizada a amplificação do gene da GAPDH humano pela PCR utilizando-se primers específicos.

A avaliação do perfil de resposta imune inata e adaptativa foi realizada por meio da amplificação de 84 genes envolvidos em diferentes vias da resposta imune inata e adaptativa pela PCR array (RT2 Profiler PCR Array System– *Via Human Innate & Adaptive Immune Responses*) (QIAGEN) utilizando ABI7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem, EUA). Os dados obtidos foram analisados por meio do método de  $\Delta\Delta CT$  pelo programa *online* GeneGlobe (<https://geneglobe.qiagen.com/br/>).

Os valores de  $\Delta CT$  obtidos para cada um dos 84 genes na análise de PCRarray foram normalizados para log<sub>2</sub> e clusterizados hierarquicamente em um heatmap pelo valor de Z (z-score). O heatmap foi gerado utilizando o software R. Os genes selecionados estavam mais expressos (*z score* > 0,5) em ambos os indivíduos do grupo caso e menos expressos (*z score* < -0,5) nos indivíduos do grupo não caso, e vice-versa. Para identificação de processos biológicos, componentes celulares e função molecular dos quais os genes selecionados participam foi feita análise de Gene Ontology usando o ShinyGO v0.60: *Gene Ontology Enrichment Analysis*

([bioinformatics.sdstate.edu/go/](http://bioinformatics.sdstate.edu/go/)). A rede de interação gênica e processos biológicos foram obtidos no programa Cytoscape (SHANNON, 2003).

#### 4.13 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 9.0 (GraphPad software) e software R (versão 3.3.2). Inicialmente, foi realizado o teste de Grubbs para identificação de *Outliers* e após o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade das variáveis analisadas. A avaliação da diferença de medianas/médias entre mais de dois grupos foi feita pelo teste de Análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Tukey ou Dunn, respectivamente, de acordo com a distribuição dos dados. O teste de correlação linear entre os níveis de anticorpos para cada grupo foi realizado através do teste de Spearman. O modelo de regressão logística múltipla foi construído para descrever associações independentes entre covariáveis (idade, sexo, número de episódios prévios de malária e tempo em meses desde o último episódio de malária) e anticorpos contra as proteínas aqui avaliadas. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%, ou seja, valores de  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Os resultados dessa tese foram divididos em duas partes para facilitar a leitura e entendimento. A primeira parte é referente à avaliação do perfil da resposta de anticorpos contra antígenos envolvidos na invasão de reticulócitos pelo *P. vivax* em indivíduos expostos ao surto de malária em área não endêmica para malária, com ênfase na caracterização da resposta imune humoral contra a proteína EBP2 por 12 meses (Artigo 1). A segunda parte são resultados da avaliação da duração da resposta imune humoral e de células B memória após 13 anos do surto de malária (resultados não publicados).

### PARTE I

#### 5.1 Perfil da resposta de anticorpos IgM e IgG antígeno específicos em indivíduos expostos ao surto autóctone de *P. vivax*

Inicialmente, avaliamos a aquisição e duração da resposta de anticorpos IgM e IgG contra antígenos de invasão de reticulócitos (DBPII variante do surto, imunógeno sintético DEKnull-

2 e EBP2) do *P. vivax* durante 12 meses após a exposição única e rápida a esse parasito. Além disso, a proteína bem caracterizada e altamente imunogênica, a MSP1-19, também foi incluída. O estudo incluiu amostras de plasma coletadas imediatamente após o período agudo do surto (linha de base – BL) e em 3, 6 e 12 meses de indivíduos do grupo caso e não-caso. As características demográficas, epidemiológicas e imunológicas na linha de base do estudo estão na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Características demográficas, epidemiológicas e imunológicas dos indivíduos expostos ao surto de *P. vivax* em Sousa na linha de base

Características	Caso <sup>1</sup>	Não Caso <sup>2</sup>	
	(n=16)	(n=22)	
Idade, anos (mediana, IRQ <sup>3</sup> )	27 (20-42)	24 (20-45)	
Gênero, Masculino: feminino, razão	2:1	0,4:1	
Resposta de anticorpo <sup>4</sup> , n (%)			
IgM	EBP2	1 (6%)	0 (0%)
	DBPII <sup>5</sup>	0 (0%)	0 (0%)
	DEKnull-2	1 (6%)	1 (5%)
	MSP1-19	9 (56%)	1 (5%)
IgG	EBP2	0 (0%)	0 (0%)
	DBPII	2 (13%)	0 (0%)
	DEKnull-2	1 (6%)	0 (0%)
	MSP1-19 <sup>6</sup>	11 (69%)	0 (0%)

<sup>1</sup>Indivíduos que apresentaram sintomas febris e diagnóstico microscópico positivo de malária pelo *P. vivax*

<sup>2</sup>Indivíduos expostos ao risco de infecção por *P. vivax*, mas sem sintomas clínicos

<sup>3</sup>IQR = Intervalo Interquartil

<sup>4</sup>Avaliado por sorologia convencional (ELISA) usando proteínas recombinantes de *P. vivax*

<sup>5</sup>Foi utilizada para avaliação sorológica a DBPII recombinante referente a variante do surto

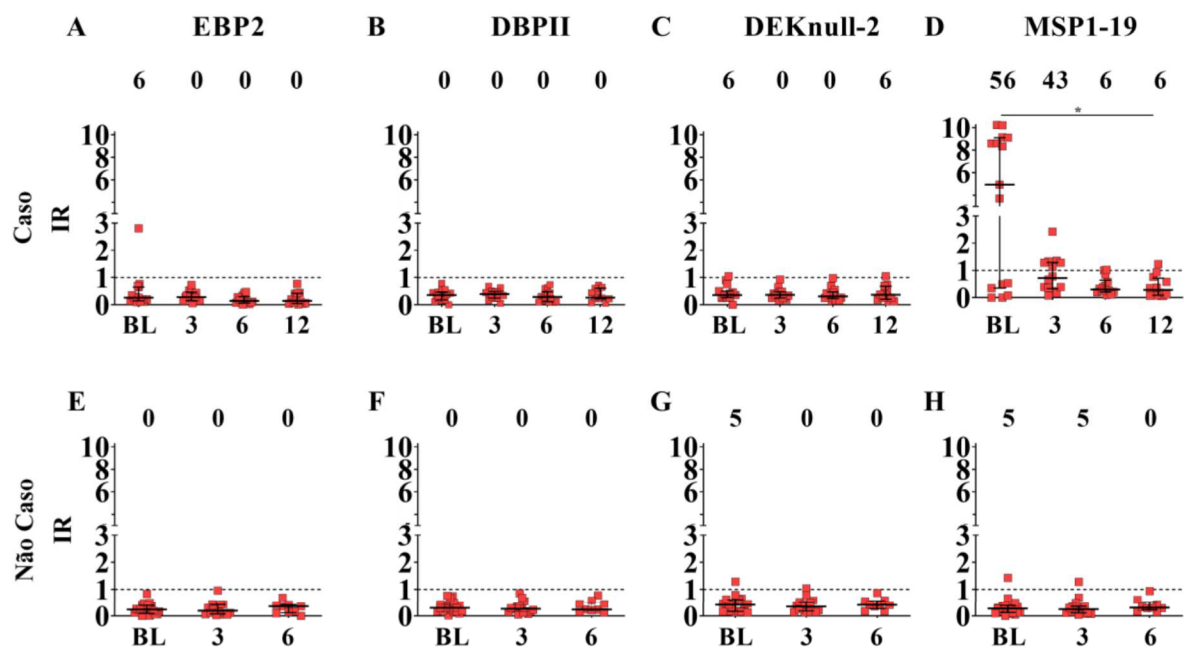
<sup>6</sup>De acordo com CERAVOLO et al., 2009

Na linha de base, apenas 6% (1/16) dos indivíduos do grupo *caso* apresentaram anticorpos IgM contra EBP2 e DEKnull-2, e nenhuma resposta positiva foi detectada para DBPII. Por outro lado, 56% (9/16) do grupo *caso* apresentaram resposta positiva de IgM contra MSP1-19. Para o grupo *não-caso*, observamos que um indivíduo (5%) apresentou anticorpos IgM contra DEKnull-2 e MSP1-19. Em relação a resposta de anticorpos do tipo IgG, 69% (11/16) dos indivíduos caso foram positivos para MSP1-19, seguido de 13% (2/16) para DBPII e 6% para DEKnull2 (1/16). Não foi detectada resposta de IgG positiva para EBP2. Como esperado, nenhum indivíduo do grupo *não caso* apresentou resposta positiva de IgG contra todas as proteínas avaliadas (**Tabela 1**).

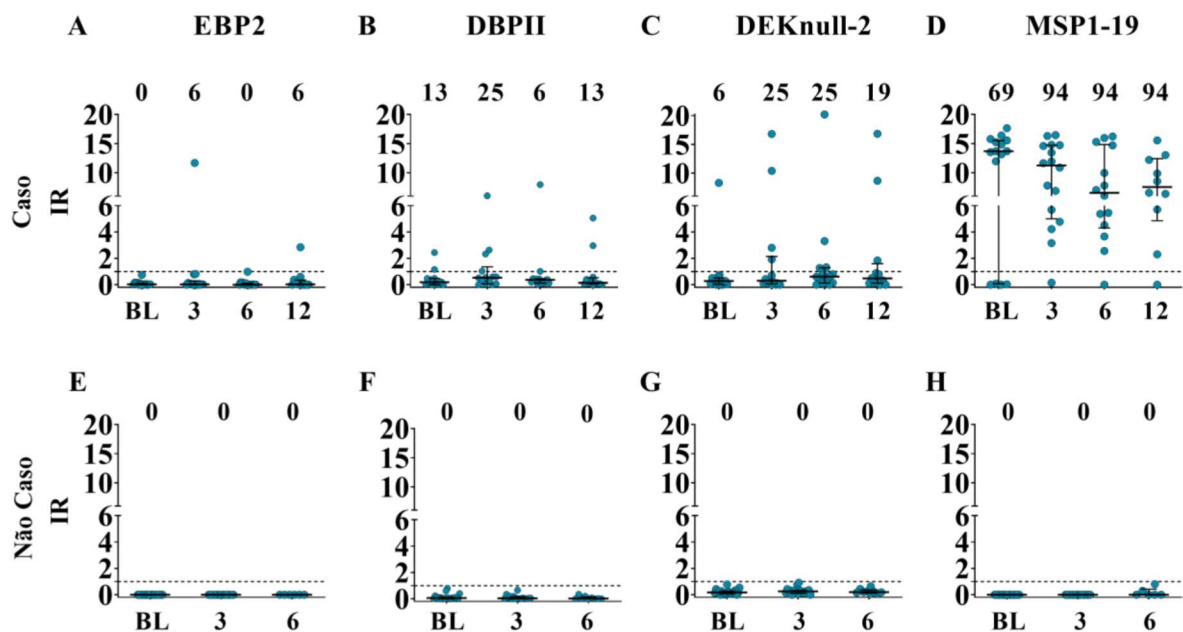
Em seguida, observamos que a resposta de anticorpos IgM contra EBP2, DBPII e DEKnull-2 permaneceu negativa no grupo *caso*, exceto um único indivíduo (1/16) apresentou nível de IgM contra DEKnull-2 com baixa reatividade aos 12 meses (**Figura 7A-C**). No grupo *caso*, enquanto a frequência de anticorpos IgM contra MSP1-19 foi de 56% na linha de base, houve uma queda significativa para 43% e 6% nos tempos 6 e 12 meses, respectivamente (Chi-quadrado,  $p=0,0005$ ) (**Figura 7D**). Essa queda também foi observada nos níveis de anticorpos IgM. Para os indivíduos do grupo *não-caso*, não foi detectada resposta de IgM positiva para as proteínas estudadas, exceto para MSP1-19 onde um indivíduo apresentou uma resposta no limiar da positividade (**Figura 7E-H**).

Em relação aos anticorpos IgG, apenas um indivíduo apresentou anticorpos IgG contra EBP2 detectável nos tempos de 3 e 12 meses (6%) (**Figura 8A**). Para DBPII e DEKnull-2 houve um aumento na frequência de respondedores para 25% aos 3 meses (**Figura 8B-C**). No entanto, a proporção de respondedores de IgG contra DBPII flutuou ao longo dos 12 meses, enquanto para DEKnull-2, a resposta foi estável e com níveis de IgG mais elevados durante os 12 meses de acompanhamento. Para MSP1-19, a proporção de indivíduos respondedores se manteve acima de 90% a partir do terceiro mês, mantendo-se estável com altos níveis de reatividade por todo o período do estudo (**Figura 8D**). Como esperado, nenhum indivíduo do grupo *não-caso* apresentou resposta detectável de IgG para os antígenos avaliados (**Figura 8E-F**).

**Figura 7. Resposta de anticorpos IgM contra antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* no surto de malária.** As respostas de anticorpos IgM antígenos-específicos de *P. vivax* foram avaliadas ao longo de um ano (BL, 3, 6 e 12 meses) após o surto de malária nos indivíduos expostos dos grupos caso e não caso. A resposta de anticorpos contra (A, E) EBP2, (B, F) DBPII, (C, G) DEKnull2, e (D, H) MSP1-19 foram expressos em índice de reatividade (IR). O IR foi obtido pela divisão da média da Densidade Óptica ( $DO_{492nm}$ ) de cada amostra pelo valor do *cut-off* (média da  $DO_{492nm}$  de 30 indivíduos nunca expostos ao risco de contrair malária) determinado para cada proteína. Amostras com valores de  $IR > 1$  foram consideradas positivas. A linha pontilhada no gráfico indica IR igual 1. As frequências de positivos estão representadas em porcentagem nos diferentes tempos (eixo Y).



**Figura 8. Resposta de anticorpos IgG contra antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* no surto de malária.** As respostas de anticorpos IgG antígenos-específicos de *P. vivax* foram avaliadas ao longo de um ano (BL, 3, 6 e 12 meses) do surto de malária nos indivíduos expostos dos grupos caso e não caso. A resposta de anticorpos contra (A, E) EBP2, (B, F) DBPII, (C, G) DEKnull2, e (D, H) MSP1-19 foram expressos em índice de reatividade (IR). O IR foi obtido pela divisão da média da Densidade Óptica ( $DO_{492nm}$ ) de cada amostra pelo valor do *cut-off* (média da  $DO_{492nm}$  de 30 indivíduos nunca expostos ao risco de contrair malária) determinado para cada proteína. Amostras com valores de  $IR > 1$  foram consideradas positivas. A linha pontilhada no gráfico indica IR igual 1. As frequências de positivos estão representadas em porcentagem nos diferentes tempos (eixo Y).

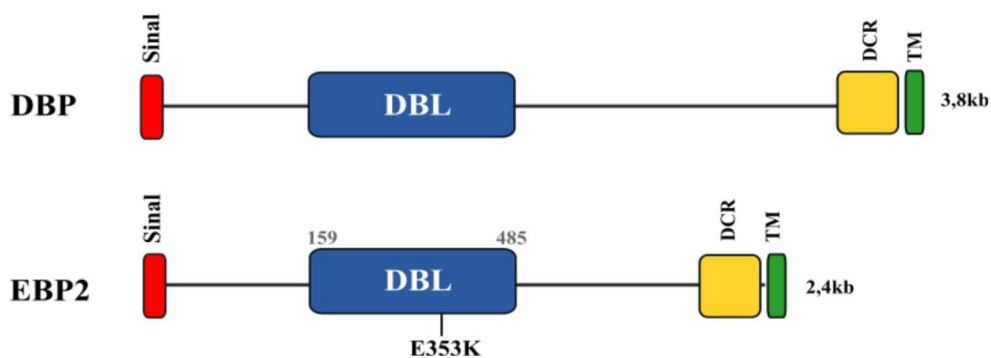


## 5.2 Sequenciamento do gene *ebp2* do isolado de *P. vivax* do surto de malária

Devido à baixa frequência de resposta de anticorpos contra EBP2 em indivíduos expostos ao surto de *P. vivax*, nos questionamos se polimorfismo genético da região da DBL de EBP2 poderia estar associado com a resposta de anticorpos variante-específica, o que explicaria a baixa resposta de anticorpos para essa proteína. Para isso, o gene da região II completa (domínio DBL, aminoácido 159-485) da EBP2 foi sequenciado (**Figura 9**). Como anteriormente, nosso grupo identificou que as sequências de DNA de amostras do momento do surto e infecções de *P. vivax* recorrentes foram devido a um único alelo de *dbpII* (CERAVOLO et al., 2009), a amostra S17 do isolado de *P. vivax* do surto foi selecionada. A representação esquemática (**Figura 9**) da estrutura das proteínas DBP e EBP2 mostra que ambas compartilham estruturas em comum dos membros da família DBL, incluindo o domínio DBL, considerado essencial para o reconhecimento dos receptores da célula hospedeira e consequente invasão pelos

merozoítos (HANS et al., 2005; HESTER et al., 2013; VANBUSKIRK; SEVOVA; ADAMS, 2004).

**Figura 9. Representação esquemática da estrutura das proteínas DBP e EBP2.** A figura indica estruturas compartilhadas pelas proteínas DBP e EBP2 como o peptídeo sinal (vermelho), domínio *Duffy binding-like* (DBL, em azul), domínio C-terminal rico em cisteína (DCR, em amarelo), e o domínio transmembrana (TM, em verde). O sítio contendo o polimorfismo encontrado na proteína EBP2 está indicado por um traço no domínio DBL (E353K).



(Adaptada de HESTER et al., 2013).

Pelo sequenciamento do domínio DBL da EBP2 de *P. vivax* do isolado do surto, obteve-se um total de seis *reads* de cada um dos três fragmentos gerando uma sequência consenso de 979pb. O alinhamento da sequência completa do domínio DBL da EBP2 com a sequência referência C127 (HESTER et al., 2013) identificou apenas um polimorfismo de base única (SNP) de Guanina (G) por Adenina (A) na posição 1057 (G1057A), que resultou na substituição não sinônima do aminoácido ácido glutâmico (Glu, E) pela Lisina (Lys, K) na posição 353 (E353K) (**Figura 10**).



**Figura 10: Alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio DBL da proteína EBP2 (aa 68 a 535) isolada da amostra S17 do Surto de Sousa.** O alinhamento da sequência foi gerado utilizando a amostra C127 como referência (HESTER et al., 2013; código de acesso KC987954). O polimorfismo não sinônimo, troca dos aminoácidos Glu-Lys (EK) identificado na posição 353, está mostrado na figura pelas cores vermelho e azul.

	70	80	90	100	110
EBP2 C127 ref	EIRKRAVDAIGGTPEKKQSHGEENAEIREDQSFIEMEKANTNHKNGLDES				
EBP2 S17 out	EIRKRAVDAIGGTPEKKQSHGEENAEIREDQSFIEMEKANTNHKNGLDES				
	120	130	140	150	160
EBP2 C127 ref	VEEALNEGESFIEDKSDRDSAPLVEDPTKGDENRDHAEAGADTLTSSVNNG				
EBP2 S17 out	VEEALNEGESFIEDKSDRDSAPLVEDPTKGDENRDHAEAGADTLTSSVNNG				
	170	180	190	200	210
EBP2 C127 ref	KIPTNNVAKYVFSDTSLISGCNAKREREKWCNLNGVQEQDICIPDRRAQ				
EBP2 S17 out	KIPTNNVAKYVFSDTSLISGCNAKREREKWCNLNGVQEQDICIPDRRAQ				
	220	230	240	250	260
EBP2 C127 ref	MCINNLVNVKSGNEKNLKEQVLLSLNTESQLLFNKWKHHNSFNNEEFCN				
EBP2 S17 out	MCINNLVNVKSGNEKNLKEQVLLSLNTESQLLFNKWKHHNSFNNEEFCN				
	270	280	290	300	310
EBP2 C127 ref	DLNRDYADFGNLIKGTDIVAHGNSKEVEDKQIFGENENAKSDREKWWN				
EBP2 S17 out	DLNRDYADFGNLIKGTDIVAHGNSKEVEDKQIFGENENAKSDREKWWN				
	320	330	340	350	360
EBP2 C127 ref	DNKEEFWNKLLSSVKGKKEGNVEIKECTKDATLEELPQFQRWVQEWGKE				
EBP2 S17 out	DNKEEFWNKLLSSVKGKKEGNVEIKECTKDATLEKIPQFQRWVQEWGKE				
	370	380	390	400	410
EBP2 C127 ref	YGEERPCKLQNLLEGICKEKNGLLNENRCNNEHECKRTCTAYESWIILKKE				
EBP2 S17 out	YGEERPCKLQNLLEGICKEKNGLLNENRCNNEHECKRTCTAYESWIILKKE				
	420	430	440	450	460
EBP2 C127 ref	QWDTISKKYDIVKDDEKYVKKGSNETAMKFLNELCKEKNLGDPEKIINLK				
EBP2 S17 out	QWDTISKKYDIVKDDEKYVKKGSNETAMKFLNELCKEKNLGDPEKIINLK				
	470	480	490	500	510
EBP2 C127 ref	DDEYTKLNCQVHKGVKIAGGSTKDENRGDPTSHEIRSHEGGSRAAVNGQ				
EBP2 S17 out	DDEYTKLNCQVHKGVKIAGGSTKDENRGDPTSHEIRSHEGGSRAAVNGQ				
	520	530			
EBP2 C127 ref	RDDAGRVREAPEVDENGK				
EBP2 S17 out	RDDAGRVREAPEVDENGK				

### 5.3 Influência dos episódios de recorrência de *P. vivax* na resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea em primo-infecção

Para avaliar a influência das recorrências na resposta de anticorpos contra os antígenos de *P. vivax* (EBP2, DBPII, DEKnull-2, e MSP1-19) após única exposição, os indivíduos do grupo caso foram subdivididos em: (i) *Recorrência* – indivíduos que apresentaram um ou mais



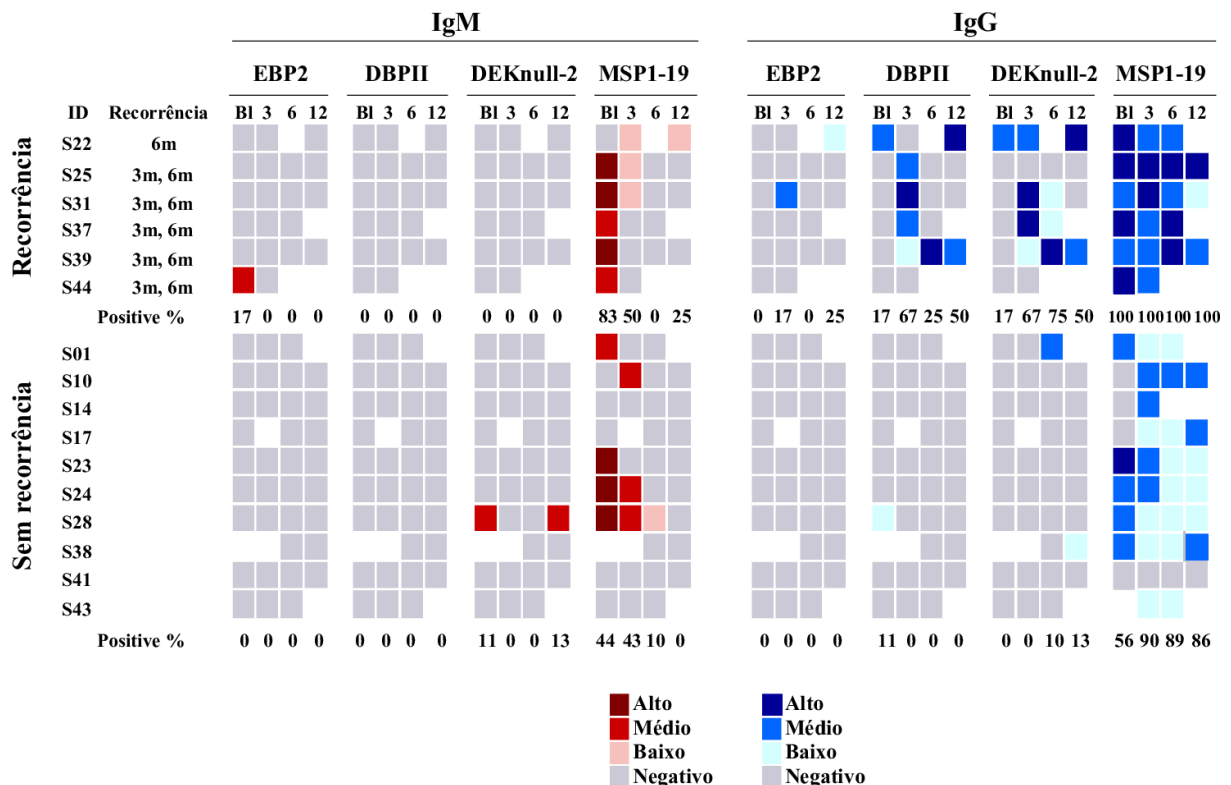
episódios de malária após a infecção aguda de *P. vivax* no período do estudo (n=6); e (ii) Sem recorrência – indivíduos que não apresentaram episódio de malária adicional (n=10). No grupo *Recorrência*, todos os indivíduos registraram duas infecções recorrentes de *P. vivax* nos tempos 3 e 6 meses, com exceção do indivíduo S22 que teve apenas um episódio de malária adicional no tempo de 6 meses. Os resultados foram organizados em um pseudo-heatmap e estão mostrados na **Figura 11**.

Nas infecções recorrentes por *P. vivax*, não foi possível detectar efeito *booster* em anticorpos IgM contra EBP2, DBPII ou DEKnull-2, já que todos os indivíduos permaneceram com resposta de anticorpos IgM não detectável (**Figura 11**). Um perfil diferente foi obtido para MSP1-19, onde a maioria dos indivíduos respondeu com títulos alto no momento do surto, mas essa resposta de anticorpos IgM apresentou uma queda nos meses seguintes para ambos os grupos *Recorrência* e *sem recorrência*.

Considerando a resposta de IgG, foi observada o efeito *booster* para DEKnull-2 e DBPII (mas não EBP2) no grupo *Recorrência* (**Figura 11**). Mais especificamente, a maioria dos casos recorrentes de *P. vivax* foi associada a níveis elevados de anticorpos IgG anti-DEKnull-2, o que resultou na proporção de positivos que variou de 50 a 75% com intensidade de baixa a alta. No entanto, o subgrupo *sem recorrência* mostrou baixa frequência de respondedores de IgG para DEKnull-2 (0 a 13%) com intensidade de baixa a média. O perfil de anticorpos IgG contra DBPII foi semelhante ao de DEKnull-2, embora a frequência e intensidade da resposta IgG para a DBPII pareceu diminuir mais rapidamente (**Figura 11**).

Em relação à MSP1-19, ambos os grupos (com e sem recorrência) mostraram alta frequência de resposta de IgG. Entretanto, enquanto 100% (6/6) dos indivíduos que tiveram *Recorrência* apresentaram de média a alta intensidade dos níveis de IgG, os indivíduos *sem recorrência* não passaram de média intensidade.

**Figura 11. Análise em *Pseudo-heatmap* da resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea nos indivíduos expostos ao surto de malária pelo *P. vivax* em Sousa. Indivíduos do grupo caso foram subdivididos em: (i) *Recorrência* (n=6) e *sem recorrência* (n=10). A resposta de anticorpos IgM (vermelho) e IgG (azul) contra EBP2, DBPII, DEKnull-2 e MSP1-19 foram obtidas por ELISA no baseline (BL), 3, 6 e 12 meses após o surto. O gradiente de cores (azul e vermelho) corresponde a intensidade nos níveis de anticorpos categorizados em alto (tercil superior), médio (tercil intermediário) e baixo (primeiro tercil) para cada proteína. A coluna “Recorrência” indica o período correspondente em que o novo episódio de malária foi registrado por cada indivíduo.**



#### 5.4 Avaliação do número de episódios prévios de malária na aquisição de anticorpos IgG contra antígenos de *P. vivax*

A avaliação da resposta de anticorpos naturalmente adquiridos contra a EBP2 entre indivíduos expostos à única e rápida infecção de *P. vivax*, associado ao fato de que o alelo de *ebp2* associado do surto de *P. vivax* apresentou alta identidade ao isolado da proteína EBP2 utilizada para detecção de anticorpos, sugere que EBP2 é um antígeno pouco imunogênico. Assim, nossa hipótese foi de que a resposta de anticorpos IgG específicos contra EBP2 pode ser dependente da longa exposição à malária. Para isso, incluímos amostras de soro de indivíduos com longa exposição à malária da região da Amazônia para avaliar a influência da exposição na resposta de anticorpos IgG contra EBP2 e outros antígenos de *P. vivax*. Estas amostras foram agrupadas

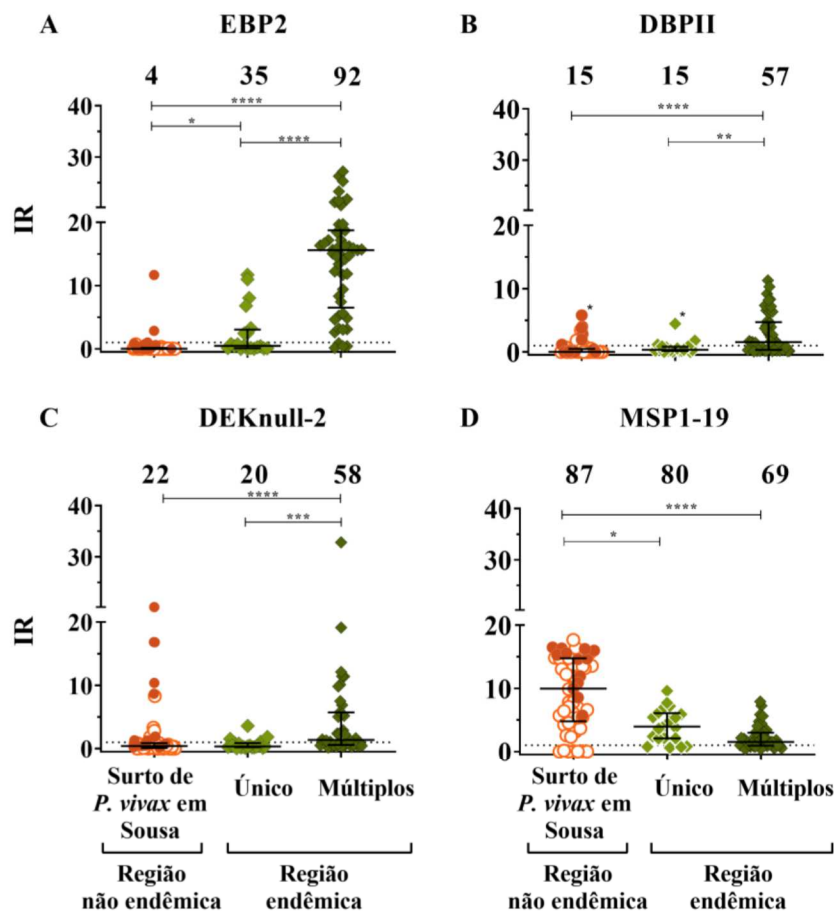
de acordo com registros em único ou múltiplos episódios clínicos de *P. vivax* obtidos no bando de dados SIVEP-Malária no período de 2003 a 2008.

Enquanto as amostras de primoinfectados do surto de *P. vivax* em Sousa (região não endêmica) apresentaram apenas 4% de positividade para EBP2, observamos que a proporção de respondedores para EBP2 com histórico de longa exposição variou de 35% (7/20) a 92% (45/49) nos grupos com de único e múltiplos episódios, respectivamente (Chi-quadrado,  $p < 0,0001$ ). Vale ressaltar que altos níveis de resposta de IgG contra EBP2 no grupo com múltiplos episódios de malária por *P. vivax* ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 12A**).

A proporção de respondedores para anticorpos IgG contra DEKnull-2 foi similar (20%) entre os grupos exposto ao surto em Sousa e com único episódio de malária. No entanto, a frequência de respondedores aumentou para 57% com altos níveis de anticorpos no grupo com múltiplos episódios de malária ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 12C**). Resultados semelhantes foram encontrados para DBPII (**Figura 12B**).

A MSP1-19, uma proteína bem caracterizada e altamente imunogênica foi incluída para comparar a resposta de IgG entre os grupos avaliados. Embora as frequências de respondedores para contra MSP-19 foram similares entre os grupos, os níveis de IgG foram mais altos no grupo exposto ao surto de *P. vivax* em Sousa ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 12D**).

**Figura 12: Resposta de anticorpos IgG contra antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* entre indivíduos com diferentes números de episódios prévios de malária.** Os níveis de anticorpos IgG contra os antígenos (A) EBP2, (B) DBPII, (C) DEKnull-2, e (D) MSP1-19 foram comparados entre indivíduos expostos ao Surto de Sousa, fora da região endêmica de malária, que apresentaram recorrência (círculo fechado) e sem recorrência (círculo aberto) (n=55), e indivíduos que vivem sob risco de contrair malária em área endêmica que apresentaram um (n=20) ou múltiplos episódios de malária (n=49). A reatividade dos soros fora expressa em Índice de reatividade (IR). O IR foi obtido pela divisão da média da Densidade Óptica (DO<sub>492nm</sub>) de cada amostra pelo valor do *cut-off* (média da DO<sub>492nm</sub> de 30 indivíduos nunca expostos ao risco de contrair malária) determinado para cada proteína. Amostras com valores de IR > 1 foram consideradas positivas. A linha pontilhada no gráfico indica IR igual 1. As frequências de positivos estão representadas em porcentagem nos diferentes tempos (eixo Y). Os asteriscos indicam a diferenças estatísticas observadas entre os grupos (\*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001, \*\*\*\* P<0.0001).



Para avaliar quais variáveis estavam associadas ao risco de desenvolver uma resposta de anticorpos às proteínas estudadas, realizamos uma análise de regressão linear múltipla ajustada por idade, sexo, número de episódios prévios de malária e o tempo desde o último episódio de malária (**Tabela 2**). Os resultados mostram que o número de episódios prévios de malária aumentou em até duas vezes a chance de ter anticorpos contra a EBP2 (aOR = 1,95, 95% CI = 1,51– 2,51, P<0.0001). Resultados similares foram observados para as proteínas DBPII e

DEKnull-2, onde os episódios prévios de malária aumentaram em 1,2 vezes a chance de ter anticorpos para ambas as proteínas (DBPII, aOR= 1,24, 95% CI= 1,10–1,39, P=0,0002; DEKnull-2, aOR =1,24, 95% CI=1,01–1.40, P=0.004). Em contrapartida, o número de episódios prévios de malária diminuiu em até 0.87 vezes a chance de o indivíduo não apresentar anticorpos contra a proteína MSP1-19 (aOR =0,87, 95% CI = 0,78– 0,97, P=0.01).

**Tabela 2** – Fatores de risco associados com a resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea de *P. vivax*

Variáveis	aOR (95% CI*)	P-valor
<b>EBP2</b>		
<i>Idade</i>	1.01 (0.97 - 1.04)	0.52
<i>Gênero</i>	0.71 (0.23 - 2.15)	0.54
<i>Malária prévia**</i>	<b>1.95 (1.51 - 2.51)</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<i>Tempo da última malária (meses)</i>	1.09 (0.98 - 1.21)	0.09
<b>DBPII</b>		
<i>Idade</i>	0.99 (0.97 - 1.02)	0.87
<i>Gênero</i>	0.68 (0.29 - 1.60)	0.38
<i>Malária prévia**</i>	<b>1.24 (1.10 - 1.39)</b>	<b>0.0002</b>
<i>Tempo da última malária (meses)</i>	0.98 (0.93 - 1.04)	0.59
<b>DEKnull-2</b>		
<i>Idade</i>	1.00 (0.97 - 1.02)	0.93
<i>Gênero</i>	1.30 (0.57 - 2.96)	0.52
<i>Malária prévia**</i>	<b>1.24 (1.01 - 1.40)</b>	<b>0.0004</b>
<i>Tempo da última malária (meses)</i>	0.99 (0.94 - 1.05)	0.91
<b>MSP1-19</b>		
<i>Idade</i>	0.98 (0.95 - 1.01)	0.24
<i>Gênero</i>	1.74 (0.68 - 4.42)	0.24
<i>Malária prévia**</i>	<b>0.87 (0.78 - 0.97)</b>	<b>0.01</b>
<i>Tempo da última malária (meses)</i>	0.99 (0.93 - 1.05)	0.80

Em negrito indica diferença estatística significativa com nível de significância de 5% (P-valor <0,05)

\*Intervalo de confiança 95% da *odds ratio* ajustada (aOR);

\*\*Número de episódios de malária

## PARTE II

Os resultados da primeira parte da presente tese mostraram que indivíduos expostos uma breve e única vez ao *P. vivax* foram capazes de produzir anticorpos contra proteínas de fase sanguínea do parasito por pelo menos 12 meses. Portanto, na segunda parte do estudo avaliamos se células B de memória (MBCs) antígeno-específicas ainda seriam detectáveis após 13 anos da exposição ao *P. vivax*, na ausência de uma reexposição ao parasito. Para isso, amostras de sangue total para obtenção de plasma e PBMC foram coletas 13 anos após a exposição ao *P. vivax* de indivíduos do grupo Caso, não-caso e o controle de área (residentes em Sousa não expostos ao *P. vivax*).

A seguir, os experimentos foram realizados com o objetivo de caracterizar a resposta de memória para o principal candidato à vacina contra *P. vivax*, a DBPII e seu imunógeno sintético DEKnull-2. Adicionalmente, a proteína bem caracterizada MSP1-19 foi incluída como um controle.

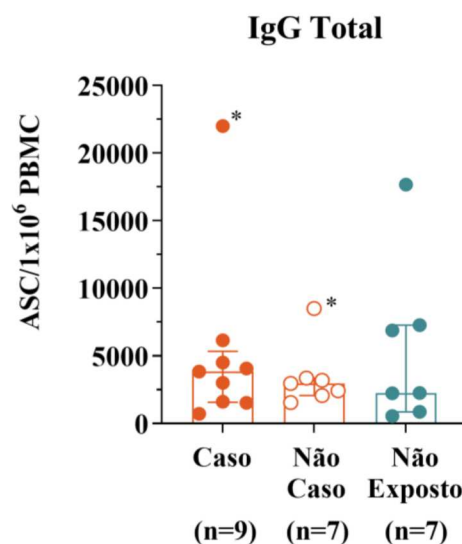
Segunda parte, consistirá na: (1) avaliação a presença de MBCs IgG<sup>+</sup> antígeno-específicas pelo ensaio de ELISpot; (2) identificação por imunofenotipagem do perfil de subpopulações de células B no *pool* de PBMCs estimuladas com antígeno de *P. vivax* e, finalmente, (3) avaliação da expressão diferencial de genes relacionados à imunidade inata e adaptativa pela técnica de PCRarray.

### **5.5. Avaliação da resposta de células B de memória antígeno-específicas em indivíduos expostos ao surto autóctone de *P. vivax* por ELISpot**

Inicialmente, após a nova coleta (13 anos passados do surto), realizamos a sorologia para detecção de anticorpos contra as proteínas de fase sanguínea DBPII, DEKnull-2 e MSP1-19 que não detectou anticorpos IgM ou IgG circulantes no plasma de nenhum dos indivíduos incluídos nessa parte do trabalho (dados não mostrados). Posteriormente, com o intuito de avaliar o bom funcionamento da técnica de ELISpot quantificamos a diferenciação de MBCs totais *in vitro* em células secretoras de anticorpos IgG (ASCs IgG<sup>+</sup>) para os grupos estudados. Os resultados mostraram que a mediana do número de ASCs IgG<sup>+</sup> de 3430 (IQR, 1558-4410), 2690 (1950-3240) e 2260 (870-7280) ASCs/10<sup>6</sup> PBMC foram semelhantes entre os grupos

expostos caso, não caso e o grupo não exposto, respectivamente (Kruskal-Wallis,  $p=0,89$ ) (Figura 13).

**Figura 13: Avaliação da produção de células secretoras de anticorpos (ASCs) IgG total em indivíduos exposto (caso e não caso) e não exposto ao surto autóctone ocorrido há 13 anos no distrito de Sousa, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais.** O número de ASCs para cada grupo foram expressos por milhão ( $1 \times 10^6$ ) de células mononucleadas do sangue periférico (PMBC). Grupo exposto: caso e não caso, não exposto (controle de área). Cada ponto no gráfico representa um indivíduo. As linhas horizontais indicam a mediana e o intervalo interquartil. A comparação entre o número de ASCs entre os grupos foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ). Os *outliers* foram identificados pelo teste de grubbs e removidos da análise para fins de análise estatística.



Em seguida, determinamos o número de ASCs IgG+ para cada antígeno (MSP1-19, DBPII e DEKnull-2) nos grupos exposto caso e não caso além do não exposto. Para melhor avaliação o resultado obtido para cada proteína de *P. vivax* foi categorizado em negativo, baixo e alto baseado no intervalo interquartil (IRQ) do número de ASC IgG+ apresentadas. Dessa forma, valores abaixo das medianas foram considerados como resposta negativa; valores compreendidos entre 50% (mediana) e 75% (IQR superior) foram categorizados como resposta baixa, e valores superiores a 75% (IQR superior) foram considerados alta resposta de ASCs IgG+. Os valores referentes aos intervalos para cada proteína foram detalhados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Categorização da resposta de ASCs IgG+ antígeno específica de *P. vivax*.

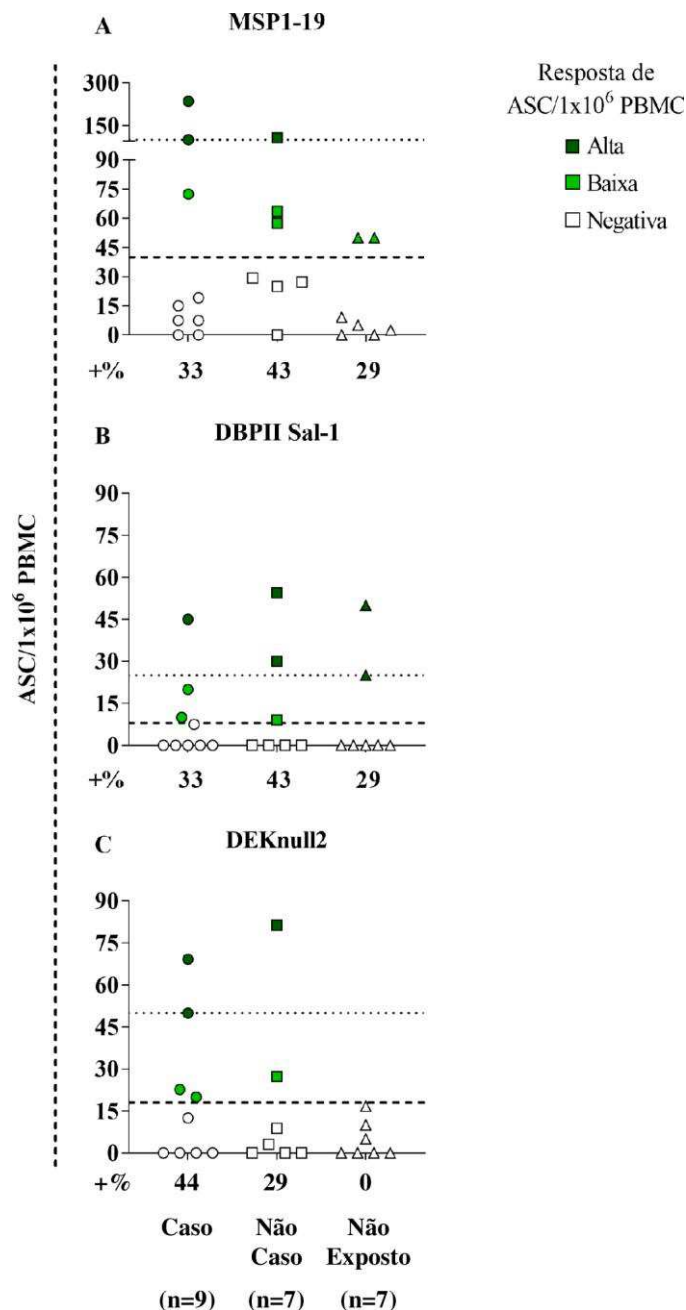
Proteína	Resposta de ASC IgG+ (número de spots)		
	Alta (> 75%)	Baixa (50 – 75%)	Negativa (≤ 50%)
MSP1-19	≥ 100	42 - 99	≤ 41
DBPII	≥ 26	9 - 25	≤ 8
DEKnull-2	≥ 51	19 - 50	≤ 18

Os resultados mostram que os indivíduos expostos ao surto (caso e não caso) foram capazes de produzir e manter as MBCs antígeno-específicas circulantes para as três proteínas avaliadas por até 13 anos após o surto de malária (**Figura 14**). Mais especificamente, observamos que as frequências de ASCs IgG+ positivas para as MSP1-19 e DBPII foram iguais nos grupos caso (33%) e não caso (43%) (**Figura 14 A-B**). No entanto, a intensidade da resposta de ASCs IgG+ específica para MSP1-19 foi maior (>42 ASCs/ 10<sup>6</sup> de PBMC) quando comparada com a resposta de ASCs IgG+ para DBPII (>25 ASCs/ 10<sup>6</sup> de PBMC). Além disso, observamos que dois dos indivíduos não expostos (29%) apresentaram resposta de ASCs IgG+ para as proteínas MSP1-19 e DBPII. Para DEKnull-2 observamos que 44% do grupo caso e 29% do não-caso apresentaram ASCs IgG+ específicas (**Figura 14C**). Nenhum indivíduo não exposto apresentou resposta de ASCs IgG+ para DEKnull-2.

Entre as proteínas de *P. vivax* aqui testadas a MSP1-19 mostrou a maior contagem de ASCs IgG+ antígeno-específicas, sendo que, dois indivíduos caso e um não caso apresentaram alta resposta com quantidades superiores a 100 ASCs/10<sup>6</sup> PBMC. A alta resposta de ASCs IgG+ para DBPII (≥ 25 ASCs/ 10<sup>6</sup> PBMC) e DEKnull2 (≥ 18 ASCs/10<sup>6</sup> PBMC) foi observada em três indivíduos expostos (caso e não caso).



**Figura 14. Células Secretoras de anticorpos (ASCs) IgG+ antígeno específicas de *P. vivax* em indivíduos residente em Sousa expostos (caso e não caso) e não expostos (controle da área) ao surto de malária.** Os resultados foram expressos em células secretoras de anticorpos (ASCs) por milhão ( $1 \times 10^6$ ) de células mononucleadas do sangue periférico (PMBC) para (A) MSP1-19; (B) DBPII e (C) DEKnull-2. A resposta foi categorizada em negativo (símbolos em branco), baixo (símbolos em verde claro) e alta (símbolos em verde escuro) pelo intervalo interquartil do número de ASCs específicas para cada proteína. Cada ponto no gráfico representa um indivíduo. As linhas horizontais pontilhadas delimitam os altos respondedores enquanto as linhas horizontais pontilhadas inferiores indicam a resposta negativa. A comparação das medianas do número de ASCs específicas entre os grupos foi realizada utilizando ANOVA ou Kruskal-Wallis quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os *outliers* foram identificados pelo teste de grubbs e removidos da análise para fins de análise estatística.



Avaliamos também a percentagem de ASCs antígeno específicas em relação à quantidade de ASCs IgG total entre os indivíduos com resposta positiva para cada proteína (**Figura 14**). Os resultados dessa análise foram organizados na **Tabela 4** e mostram que não houve diferença estatística entre os grupos (caso vs não caso vs controle de área) para nenhuma das três proteínas avaliadas (ANOVA, MSP1-19  $p=0,29$ ; DBPII  $p=0,36$ ; DEKnull2  $p=0,48$ ).

**Tabela 4- Proporção de ASCs antígeno- específicas para as proteínas MSP1-19, DBPII e DEKnull-2 em relação ao total de ASCs IgG+.** As proporções de ASCs antígeno-específicas para cada indivíduo foram calculadas em relação às ASCs IgG+ total. ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação das medianas entre os grupos, considerando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Proteína	%ASCs IgG+			<i>p</i> -valor
	Caso mediana (IRQ)	Não Caso mediana (IRQ)	Não exposto mediana (IRQ)	
MSP1-19	3,9 (1,8-6,5)	2,0 (1,3-3,7)	1,2 (0,3-2,2)	0,29
DBPII	1,1 (0,3-1,4)	1,7 (0,3-1,9)	0,3 (0,3-0,4)	0,36
DEKnull2	1,4 (0,6-3,7)	0,9 (0,8-0,9)	–	0,48

### 5.6 Avaliação do perfil imunofenotípico de PBMCs de indivíduos expostos ao surto de malária após estímulo específico

Os resultados anteriores indicam que indivíduos expostos uma única vez ao *P. vivax* são capazes de produzir e manter MBCs de longa duração por pelo menos 13 anos avaliados pelo ELISpot e células B. Nosso segundo passo consistiu em avaliar quais as subpopulações de MBCs poderiam estar contribuindo para a manutenção da memória imunológica nesses indivíduos. Para isso, PBMCs obtidos de indivíduos expostos (caso e não caso) e não expostos ao surto de malária foram estimulados com proteínas envolvidas no processo de invasão de *P. vivax* nos reticulócitos (DBPII e DEKnull-2) por 96 horas. Em seguida, foram submetidas à marcação de receptores de superfície com um painel de anticorpos para subpopulações de células B e células plasmáticas para avaliação por citometria de fluxo.

A estratégia de análise utilizada foi baseada em marcadores descritos previamente por Weiss e colaboradores (2009) com modificações. Os anticorpos e estratégia de análise

utilizadas estão descritas em detalhes no tópico matéria e métodos. Brevemente, avaliamos a frequência de células B total viáveis ( $CD19^+$ ), células B Imaturas ( $CD19^+CD10^+$ ), células B *unswitched* ( $CD19^+CD10^-IgD^+$ ), Células B naïve ( $CD19^+CD10^-IgD^+CD27^-CD21^+$ ), células B *switched* ( $CD19^+CD10^-IgD^-$ ), células B naïve/transição ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^-CD21^+$ ), MBCs ativadas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^+CD21^+$ ), MBCs clássicas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^+CD21^+$ ), MBCs atípicas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD27^-CD21^-$ ), e células plasmáticas de curta ( $CD19^+CD27^+CD20^-CD38^+$ ) e longa duração ( $CD19^+CD27^+CD20^-CD138^+$ ).

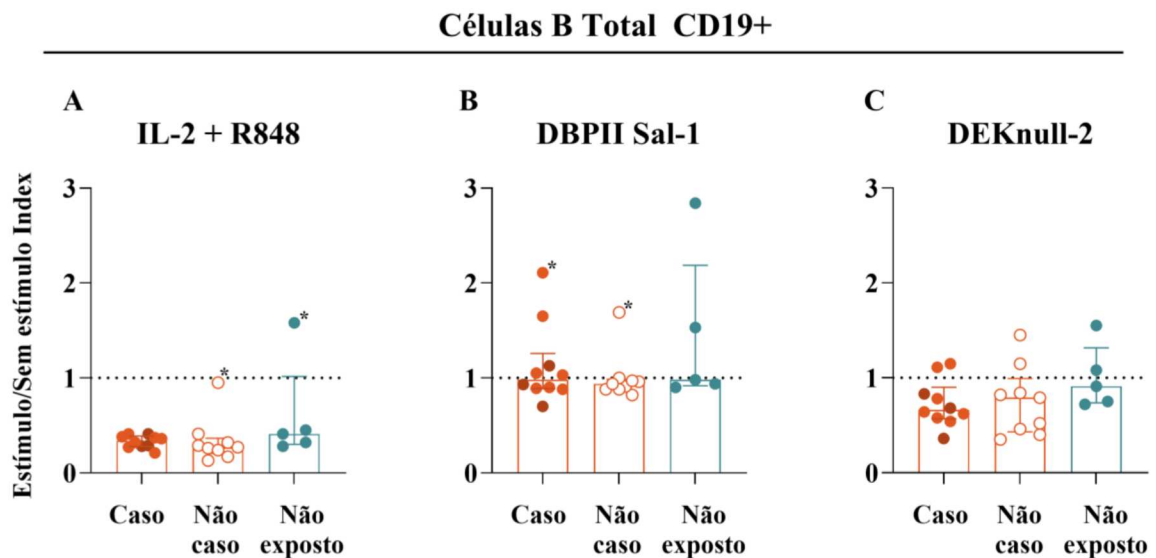
Todas as amostras de PBMC apresentaram viabilidade acima de 70% (mediana e IQR, caso = 87, 85-94; não caso = 87, 74-92; controle de área = 93, 86-94). Os resultados foram expressos em Índice de estimulação (Index) obtidos pelos valores da cultura com estímulo dividido pela cultura sem estímulo.

#### a) Células B totais

Inicialmente avaliamos as frequências de células B totais  $CD19^+$  nas culturas estimuladas com IL-2 e R848 (**Figura 15A**), DBPII (**Figura 15B**) e DEKnull-2 (**Figura 15C**). Sob o estímulo policlonal IL-2 e R848, a frequência de células B totais diminuíram nos grupos expostos (caso e não caso) e não exposto em relação a cultura sem estímulo (Index < 1), não sendo observada diferença estatística entre os grupos (ANOVA,  $p=0,07$ ).

Para as culturas estimuladas com a proteína DBPII observamos que 50% (5/10) dos indivíduos caso apresentaram níveis superiores em relação ao controle de células B totais (Index >1), enquanto os grupos não caso e não expostos apresentaram níveis semelhantes ao encontrado na cultura não estimulada. Quando avaliamos a cultura sob estímulo com DEKnull-2, não houve aumento significativo para nenhum dos grupos avaliados em relação as células B totais. Para ambas as proteínas não houve diferença estatística entre os níveis de células B entre os grupos avaliados (DBPII – Kruskal-Wallis,  $p=0,27$ ; DEKnull-2 – ANOVA,  $p=0,28$ ).

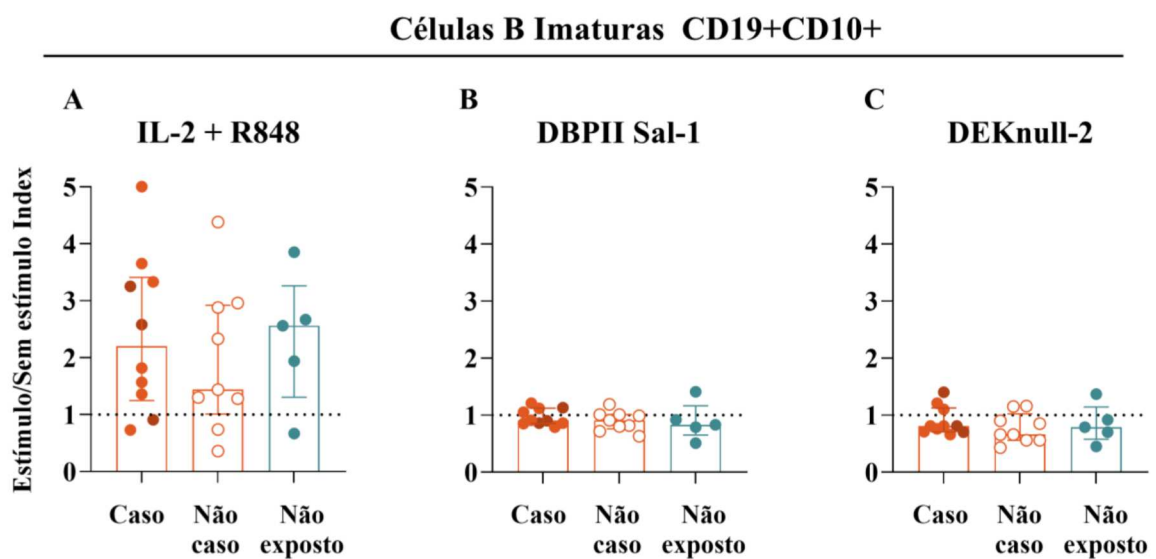
**Figura 15. Células B total CD19<sup>+</sup> em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária.** A Frequência relativa de células B total CD19<sup>+</sup> em PBMCs foram avaliadas em indivíduos do grupo expostos caso (n=10), não caso (n=9), bem como de não exposto (controle de área, n=5) após 96h na presença de (A) ativador policlonal IL-2 e R848, ou (B) DBPII Sal1 e (C) DEKnull2. Os resultados foram expressos como a mediana  $\pm$  intervalo interquartil do índice calculado pela cultura estimulada com os respectivos antígenos específicos / cultura sem estímulo específico. A linha tracejada indica a razão de equivalência entre as culturas (índice = 1). A comparação da diferença da frequência de células B entre os grupos foi realizada utilizando teste ANOVA (paramétrico) ou teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os *Outliers* foram identificados pelo teste de grubbs para fins de análise estatística.



*b) Células B imaturas*

A partir das células B totais viáveis, avaliamos as frequências de células B imaturas (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) entre os grupos estudados (**Figura 16**). Sob o estímulo com IL-2 + R848 (**Figura 16A**) houve um aumento similar na subpopulação de células B imaturas nos três grupos (ANOVA,  $p=0,73$ ). Em contrapartida, sob os estímulos com DBPII e DEKnull-2 (**Figura 16B-C**) não houve diferença na subpopulação de células B imaturas entre os grupos (DBPII – ANOVA,  $p=0,69$ ; DEKnull-2 – Kruskal-Wallis,  $p=0,50$ ).

**Figura 16. Células B imaturas (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária.** A Frequência relativa de células imaturas em PBMCs foram avaliadas em indivíduos do grupo expostos caso (n=10), não caso (n=9), bem como de não exposto (controle de área, n=5) após 96h na presença de (A) ativador policlonal IL-2 e R848, ou (B) DBPII Sal1 e (C) DEKnull2. Os resultados foram expressos como a mediana  $\pm$  intervalo interquartil do índice calculado pela cultura estimulada com os respectivos antígenos específicos / cultura sem estímulo específico. A linha tracejada indica a razão de equivalência entre as culturas (índice = 1). A comparação da diferença da frequência de células B entre os grupos foi realizada utilizando teste ANOVA (paramétrico) ou teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os *Outliers* foram identificados pelo teste de grubbs para fins de análise estatística.

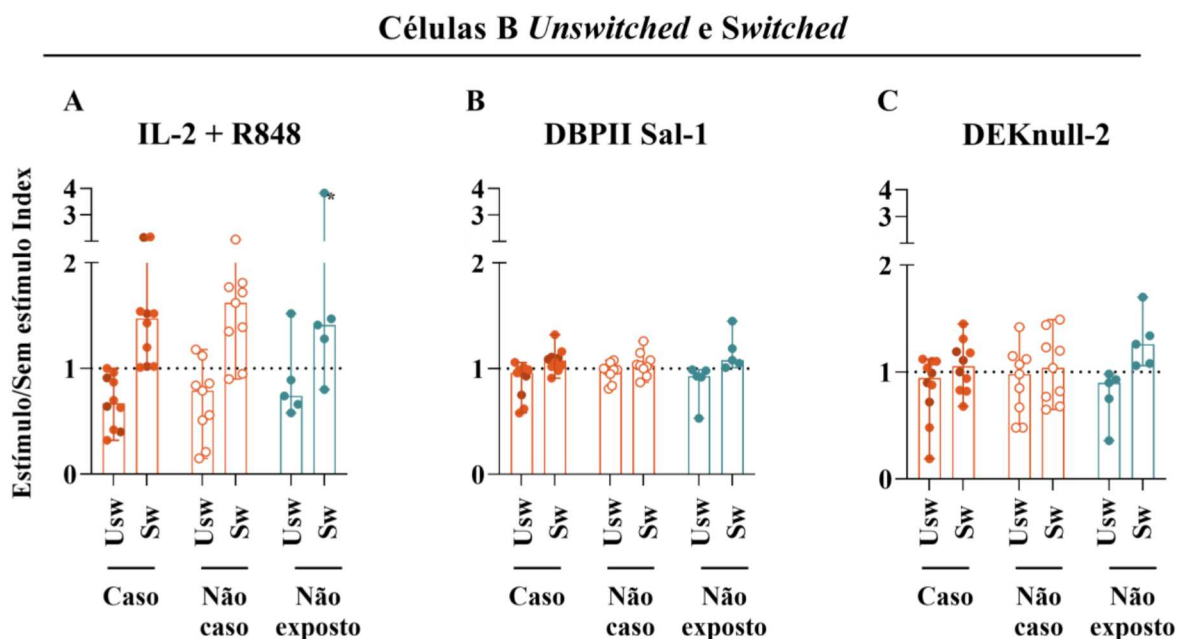


*c) Células B Unswitched e Switched*

A subpopulação de células B maduras, ou seja, não expressão o marcador CD10, foram segregadas pela expressão de IgD em células B *Unswitched* (IgD<sup>+</sup>) - células que não sofreram diferenciação ou troca de classe de imunoglobulinas na superfície celular; e células B *Switched* (IgD<sup>-</sup>) - células que já sofreram o processo de diferenciação (**Figura 17**).

Sob o estímulo com IL-2+R848 (**Figura 17A**) houve um predomínio de células B diferenciadas (*Switched*) quando comparado com células B não diferenciadas (*Unswitched*) para os três grupos avaliados. Ainda que em níveis discretos no grupo caso sob estímulo com antígenos de *P. vivax*, não houve diferença no balanço destas subpopulações de células B nos tratamentos nos respectivos grupos avaliados (**Figura 17B-C**).

**Figura 17. Células B *Unswitched* (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>) e *Switched* (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária.** A Frequência relativa de células B unswitched e switched em PBMCs foram avaliadas em indivíduos do grupo expostos caso (n=10), não caso (n=9), bem como de não exposto (controle de área, n=5) após 96h na presença de (A) ativador policlonal IL-2 e R848, ou (B) DBPII Sal1 e (C) DEKnull2. Os resultados foram expressos como a mediana  $\pm$  intervalo interquartil do índice calculado pela cultura estimulada com os respectivos antígenos específicos / cultura sem estímulo específico. A linha tracejada indica a razão de equivalência entre as culturas (índice = 1). A comparação da diferença da frequência de células B entre os grupos foi realizada utilizando teste ANOVA (paramétrico) ou teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os *Outliers* foram identificados pelo teste de grubbs para fins de análise estatística.

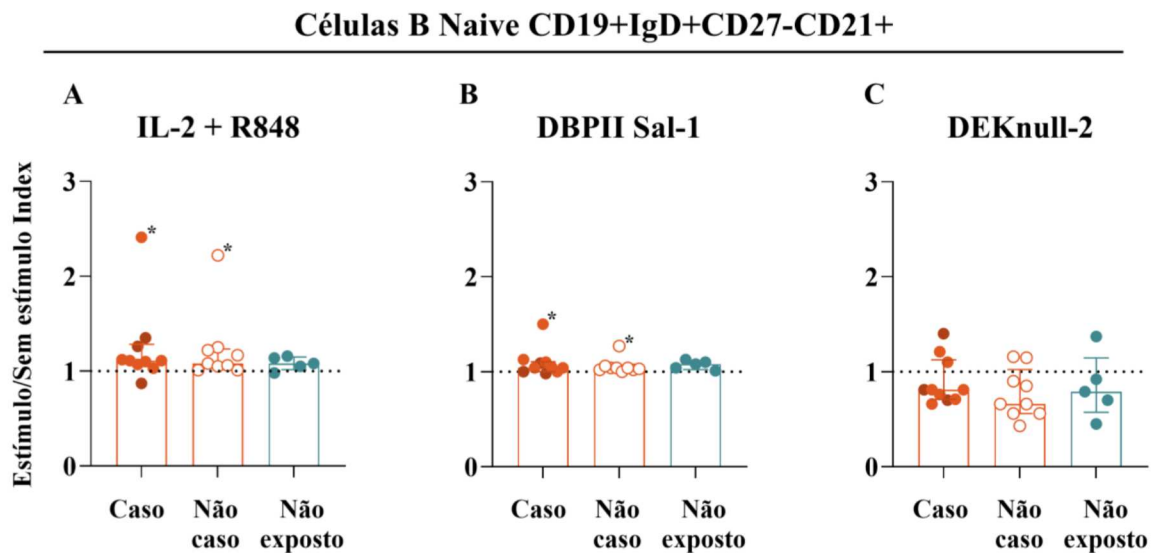


*d) Células B Naive*

A partir do *gate* de células B não diferenciadas (IgD<sup>+</sup>) identificamos a subpopulação de células B naïve (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>). Para essa subpopulação foi observado um discreto aumento no tratamento entre os grupos com IL-2+R848 e DBPII em relação ao controle não houve diferença estatística (ANOVA,  $p=0,87$ ) (**Figura 18A-B**). No entanto, sob estímulo com DEKnull-2 houve uma tendência de redução das células B naïve nos três grupos avaliados (Kruskal-Wallis,  $p= 0.50$ ) (**Figura 18C**).



**Figura 18. Células B Naive ( $CD19^+CD10^+IgD^+CD27^-CD21^+$ ) em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária.** A Frequência relativa de células B naive em PBMCs foram avaliadas em indivíduos do grupo expostos caso ( $n=10$ ), não caso ( $n=9$ ), bem como de não exposto (controle de área,  $n=5$ ) após 96h na presença de (A) ativador policlonal IL-2 e R848, ou (B) DBPII Sal1 e (C) DEKnull2. Os resultados foram expressos como a mediana  $\pm$  intervalo interquartil do índice calculado pela cultura estimulada com os respectivos antígenos específicos / cultura sem estímulo específico. A linha tracejada indica a razão de equivalência entre as culturas (índice = 1). A comparação da diferença da frequência de células B entre os grupos foi realizada utilizando teste ANOVA (paramétrico) ou teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ). Os *Outliers* foram identificados pelo teste de grubbs para fins de análise estatística.



e) *Células B de memória*

Para avaliarmos as subpopulações de células B de memória (MBCs), a partir do *gate* das células B diferenciadas ( $IgD^-$ ), e expressão de  $CD20^+$  identificamos, pelos marcadores  $CD27$  e  $CD21$ , as subpopulações de MBCs clássicas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^+CD21^+$ ), ativadas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD20^+CD27^+CD21^-$ ) e atípicas ( $CD19^+CD10^-IgD^-CD27^-CD21^-$ ).

Nossos resultados mostram que sob estímulo policlonal IL-2+R848 não houve alteração significativa em MBCs clássicas nos grupos avaliados (Kruskal-Wallis,  $p=0,92$ ) (**Figura 19A**). Por outro lado, houve aumento dos níveis de MBCs ativadas e atípicas (**Figura 19B-C**) nos grupos avaliados (MBCs ativadas, ANOVA,  $p=0,47$ ; MBCs atípicas, ANOVA,  $p=0,93$ ). Sob estímulo da DBPII e DEKnull-2, observamos um perfil semelhante (**Figura 19D-I**). As MBCs ativadas e atípicas pareceram ser tiveram melhor estímulo quando comparadas com MBC

clássicas, embora houve diferença entre os três grupos avaliados (Para DBPII, MBCs ativadas, ANOVA,  $p=0,22$ ; MBCs atípicas, Kruskal-Wallis,  $p=0,53$ ; Para DEKnull-2, MBCs ativadas, Kruskal-Wallis,  $p=0,96$ ; MBCs atípicas, ANOVA,  $p=0,70$ ).

*f) Células plasmáticas*

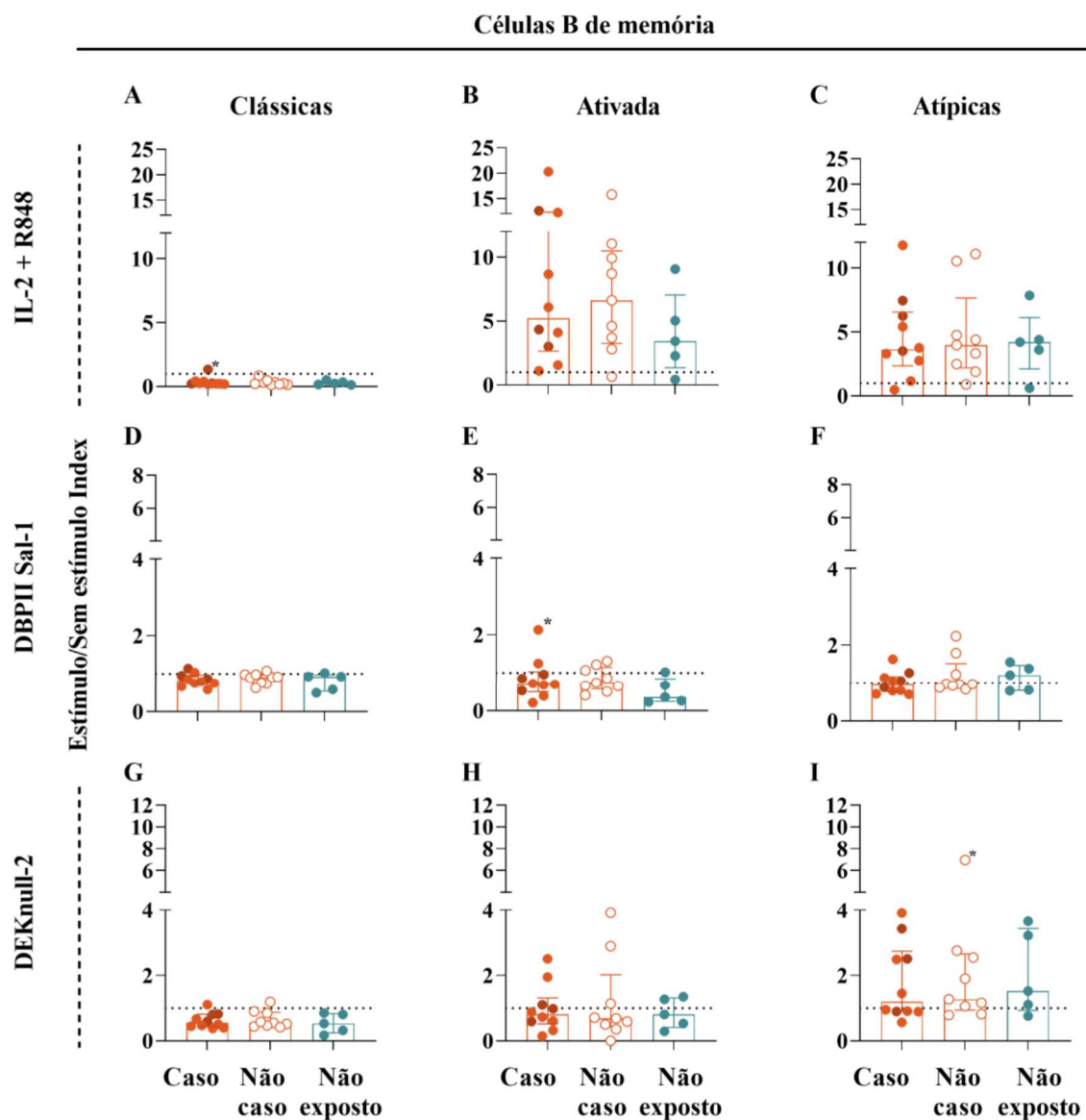
Para contemplar todas as subpopulações de células B que poderiam contribuir no desenvolvimento e manutenção da memória de longa duração nos indivíduos expostos ao surto de malária, analisamos também as subpopulações de células plasmáticas. Com essa finalidade, a partir do *gate* de células  $CD19^+$  e posteriormente  $CD27^+$ , as células plasmáticas foram identificadas pela ausência de expressão do marcador CD20 e divididas em: de  $CD38^+$  para células plasmáticas de curta duração e  $CD138^+$  de longa duração (**Figura 20**).

Sob estímulo policlonal (IL-2 e R848), observamos um aumento considerável das células plasmáticas  $CD38^+$  para todos os grupos avaliados (Kruskal-Wallis,  $p=0,56$ ) (**Figura 20A**). Em contrapartida, sob o mesmo estímulo, observamos um aumento pouco expressivo para as células plasmáticas  $CD138^+$  para os três grupos (ANOVA,  $p=0,64$ ) (**Figura 20B**).

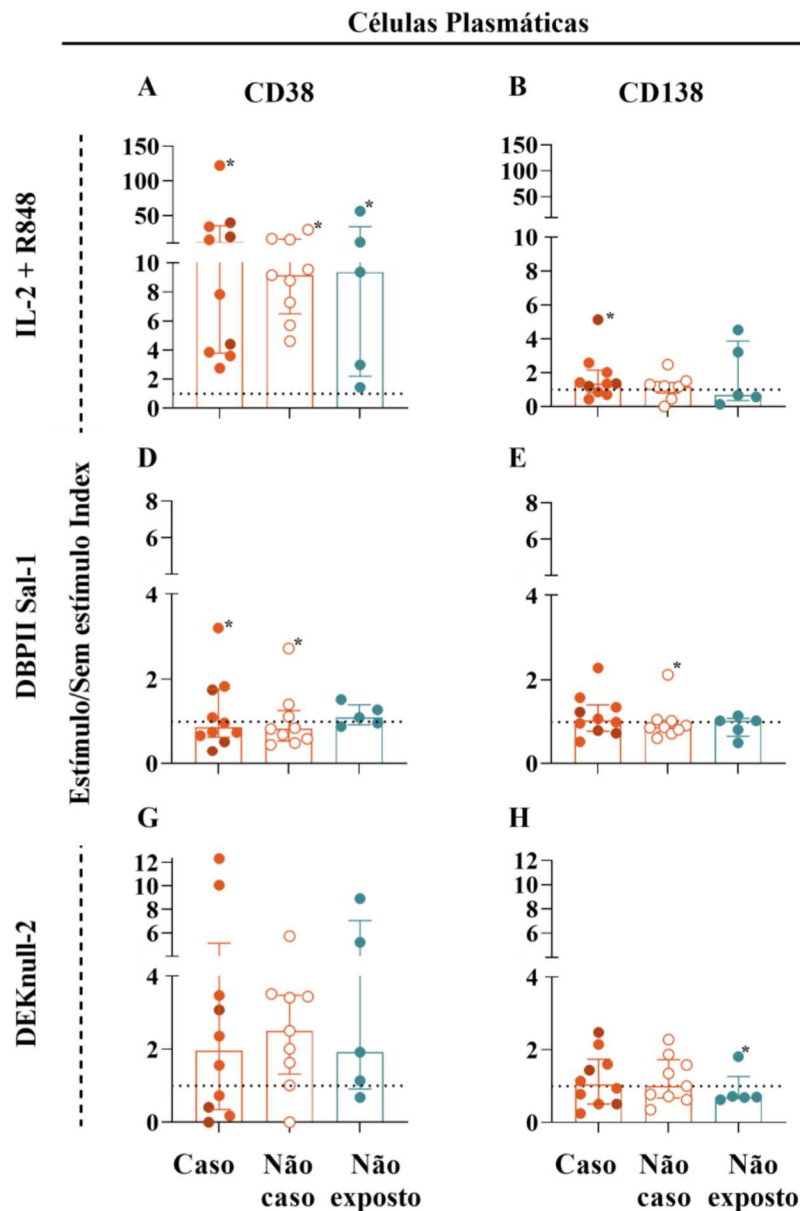
No caso do estímulo com a proteína DBPII, observamos níveis semelhantes de ambas as células plasmáticas  $CD38^+$  e  $CD138^+$  nos grupos avaliados ( $CD38^+$ , ANOVA,  $p=0,35$ ;  $CD138^+$ , ANOVA,  $p=0,21$ ) (**Figura 20D-E**). Sob o estímulo de DEKnull-2, houve um aumento de células plasmáticas  $CD38^+$  nos três grupos (Kruskal-Wallis,  $p=0,88$ ) (Figura XG) quando comparado com as células  $CD138^+$ . Contudo, observamos que os níveis de células  $CD138^+$  aumentou principalmente nos grupos de indivíduos expostos (50% caso vs 50% não caso vs 20% não exposto), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (ANOVA,  $p=0,39$ ) (**Figura 20F**).



**Figura 19. Subpopulações de células B de memória em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária.** A Frequência relativa das subpopulações das células B de memória clássicas, ativadas e atípica em PBMCs foram avaliadas em indivíduos do grupo expostos caso (n=10), não caso (n=9), bem como de não exposto (controle de área, n=5) após 96h na presença de (A, B, C) ativador policlonal IL-2 e R848, ou (D, E, F) DBPII Sal1 e (G, H, I) DEKnull2. Os resultados foram expressos como a mediana  $\pm$  intervalo interquartil do índice calculado pela cultura estimulada com os respectivos antígenos específicos / cultura sem estímulo específico. A linha tracejada indica a razão de equivalência entre as culturas (índice = 1). A comparação da diferença da frequência de células B entre os grupos foi realizada utilizando teste ANOVA (paramétrico) ou teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os *Outliers* foram identificados pelo teste de grubbs para fins de análise estatística.



**Figura 20. Células plasmáticas de curta (CD38<sup>+</sup>) e longa (CD138<sup>+</sup>) duração em amostras de PBMCs de indivíduos expostos e não expostos ao surto de malária obtidos 13 anos após o surto de malária.** O perfil das células plasmáticas de curta e longa duração em PBMCs foram avaliadas em indivíduos do grupo expostos caso (n=10), não caso (n=9), bem como de não exposto (controle de área, n=5) após 96h na presença de (A, B) ativador policlonal IL-2 e R848, ou (D, E) DBPII Sal1 e (G, H) DEKnull2. Os resultados foram expressos como a mediana  $\pm$  intervalo interquartil do índice calculado pela cultura estimulada com os respectivos antígenos específicos / cultura sem estímulo específico. A linha tracejada indica a razão de equivalência entre as culturas (índice = 1). A comparação da diferença da frequência de células B entre os grupos foi realizada utilizando teste ANOVA (paramétrico) ou teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os *Outliers* foram identificados pelo teste de grubbs para fins de análise estatística.



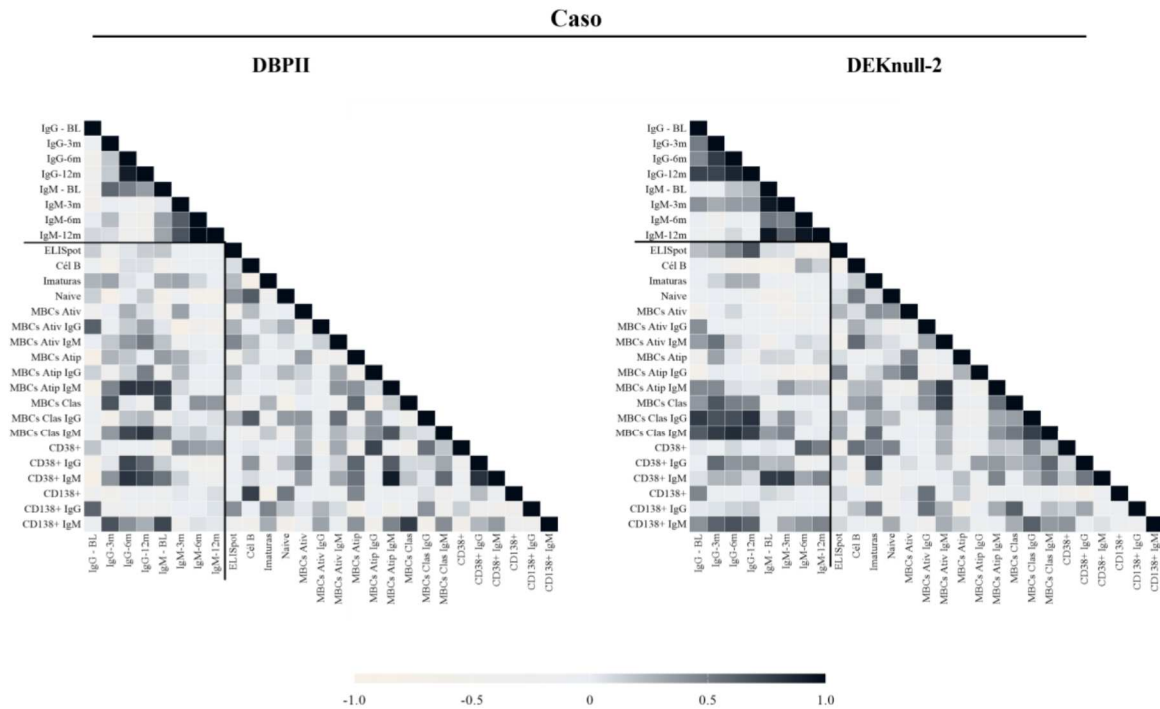
### 5.7 Correlação entre os níveis de imunoglobulinas e subpopulações de células B para os antígenos de *P. vivax*

No geral, não observamos diferenças significativas das subpopulações de células B analisadas de PBMCs de indivíduos expostos ao surto de malária há 13 anos, mesmo sob estímulos com os antígenos envolvidos na invasão de *P. vivax*. Buscando compreender as bases dessa resposta os dados de anticorpos, MBCs antígenos específicas funcionais (detectados pelo Elispot) e subpopulações de células B foram analisados em conjunto por meio de uma matriz de correlação obtidos dos indivíduos do grupo caso. (**Figura 21**).

No geral, houve uma tendência de correlação positiva mais evidente entre anticorpos IgG e células B de memória (MBC) e células plasmáticas tanto para a proteína DBPII e DEKnull-2. Os resultados mostram que correlação positiva e forte foi observada entre a resposta de anticorpos IgG<sup>+</sup> contra a DBPII e as MBCs atípicas IgM<sup>+</sup> (Spearman's = 0,80, p=0,01) e MBCs clássicas IgM<sup>+</sup> (Spearman's = 0,73, p=0,03), células plasmáticas CD38 que expressam tanto IgG<sup>+</sup> (Spearman's = 0,74, p=0,02) quanto IgM<sup>+</sup> (Spearman's = 0,82, p=0,02). Além disso, a correlação foi positiva e significativa entre a resposta de anticorpos IgM na linha de base e MBCs atípicas IgM<sup>+</sup> (Spearman's = 0,76, p=0,03) e células plasmáticas CD138 IgM<sup>+</sup> (Spearman's = 0,73, p=0,04).

Para DEKnull-2, a correlação positiva foi significativa entre anticorpos IgG (detectados ao longo de 12 meses) e MBC clássicas e células plasmáticas CD138<sup>+</sup>. Mais especificamente, a correlação foi significativa entre a resposta de anticorpos IgG<sup>+</sup> e MBCs clássicas IgG<sup>+</sup> na linha de base (Spearman's = 0.79, p=0.02), MBCs clássicas IgM<sup>+</sup> em 3 meses (Spearman's = 0.78, p=0.02) e, anticorpos IgG detectados em 6m meses teve correlação positiva com ambas MBCs clássicas, tanto que expressam IgG<sup>+</sup> (Spearman's = 0.70, p=0.04), quanto as MBC clássicas IgM<sup>+</sup> (Spearman's = 0.85, p=0.006) e células plasmáticas CD138 IgM<sup>+</sup> (Spearman's = 0.68, p=0.04). Os anticorpos IgG<sup>+</sup> 12 meses foram correlacionados com as MBCs clássicas IgG<sup>+</sup> (Spearman's = 0.83, p=0.01) e MBCs clássicas IgM (Spearman's = 0.76, p=0.03). Anticorpos IgM foram correlacionados apenas no tempo 3 meses com células plasmáticas CD38 IgM<sup>+</sup> (Spearman's = 0.79, p=0.03). Perfil semelhante, mas com menor intensidade foi observado para anticorpos IgG contra DBPII e as células B de memória.

**Figura 21. Correlação entre os níveis de anticorpos IgM e IgG e subpopulações de células B para os antígenos de *P. vivax*.** A correlação de Spearman foi calculada entre os níveis de IgG e IgM, bem como o index das subpopulações de células B contra (A) DBPII e (B) DEKnull-2 para os indivíduos do grupo caso. O gradiente de cor corresponde a força da correlação que variou de franca (branco) a forte (preto).



### 5.8 Perfil da expressão diferencial dos genes relacionados a resposta imune inata e adaptativa de PBMCs de indivíduos expostos ao surto de malária após 13 anos.

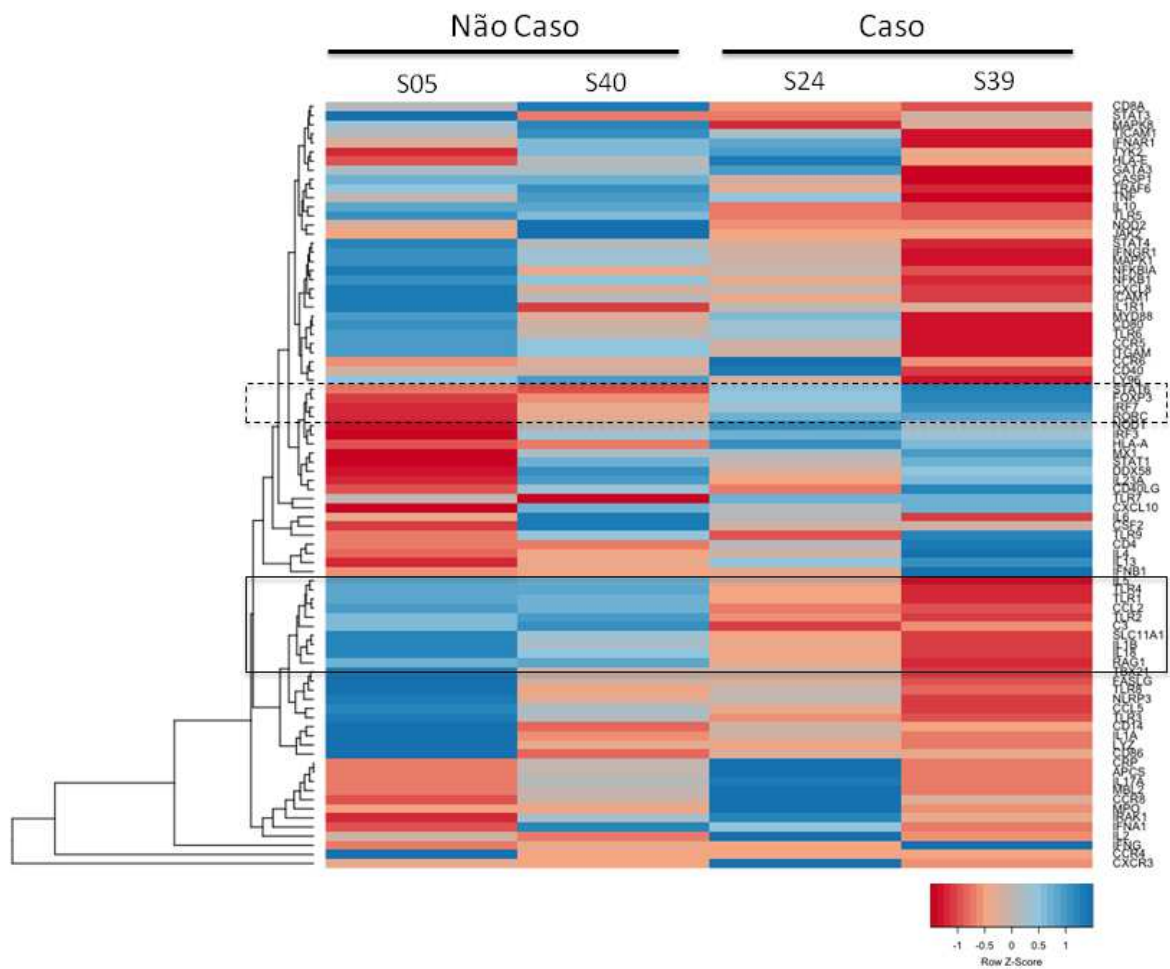
Como não observamos diferenças significativas nas subpopulações de células B, o próximo passo foi avaliar se há diferenças no perfil de expressão diferencial de genes relacionados à resposta imune inata e adaptativa em PBMC coletadas de indivíduos do grupo expostos caso e não caso após 13 anos do surto de malária. Para o experimento piloto, PBMCs de dois indivíduos de cada grupo exposto foram selecionados: (i) indivíduos caso: indivíduo S39 com resposta positiva de IgG contra DBPII e DEKnull-2 e indivíduo S24 que apresentou resposta de IgG negativa para ambas as proteínas; (ii) indivíduos não caso (S05, S40) resposta negativa para anticorpos IgG contra DBPII e DEKnull-2.

A expressão gênica relacionada à resposta imune inata e adaptativa foi analisada em PBMCs estimuladas com DBPII por 12 horas e avaliada pelo ensaio de PCRarray (Quiagen)

que incluiu amplificação de 80 genes relacionados à resposta imune inata e adaptativa e quatro genes constitutivos como controle (ver metodologia). O Heatmap (**Figura 22**) permitiu observar um padrão de genes positivamente e negativamente expressos (*up*-regulados e *down*-regulados) exclusivamente em cada grupo caso e não caso. A partir daí, os genes mais expressos ( $z\ score > 0,5$ ) em ambos os indivíduos do grupo caso e menos expressos ( $z\ score < -0,5$ ) nos indivíduos do grupo não caso, e vice-versa foram selecionados. Ao todo foram selecionados cinco genes *up*-regulados somente nos indivíduos caso e 21 genes *up*-regulados apenas nos indivíduos não caso (**Tabela 5**).

Para explorar a função dos genes *up*-regulados exclusivamente em cada grupo analisado (caso e não caso), foi feita uma análise de enriquecimento de ontologia gênica para cada grupo. A **figura 23** mostra a interação dos genes com os principais processos biológicos nos quais os genes *up*-regulados no grupo caso estão envolvidos. É possível observar que todos os genes encontrados *up*-regulados no grupo caso estão envolvidos em via de ativação da resposta imune adaptativa, tais como: regulação da produção de imunoglobulina e diferenciação de células T-helper. Além disso, a função molecular e os componentes celulares associados aos genes *up*-regulados, evidenciam participação como fatores de transcrição que atuam na ativação da resposta adaptativa (**Quadro 2**).

**Figura 22. Expressão diferencial dos genes relacionadas à imunidade inata e adaptativa em PBMCs coletadas 13 anos após o surto de malária estimuladas com DBPII avaliados pela PCRarray em indivíduos expostos não caso (S05 e S40) e caso (S24 e S39). Cada linha representa um gene avaliado, e cada coluna representa um indivíduo. As caixas exemplificam os clusters de genes selecionados. As cores vermelho e azul indicam diferentes graus de expressão gênica, sendo que os tons em vermelho indicam  $z\ score < -0,5$  variando até azul escuro quando  $z\ score > 0,5$ .**



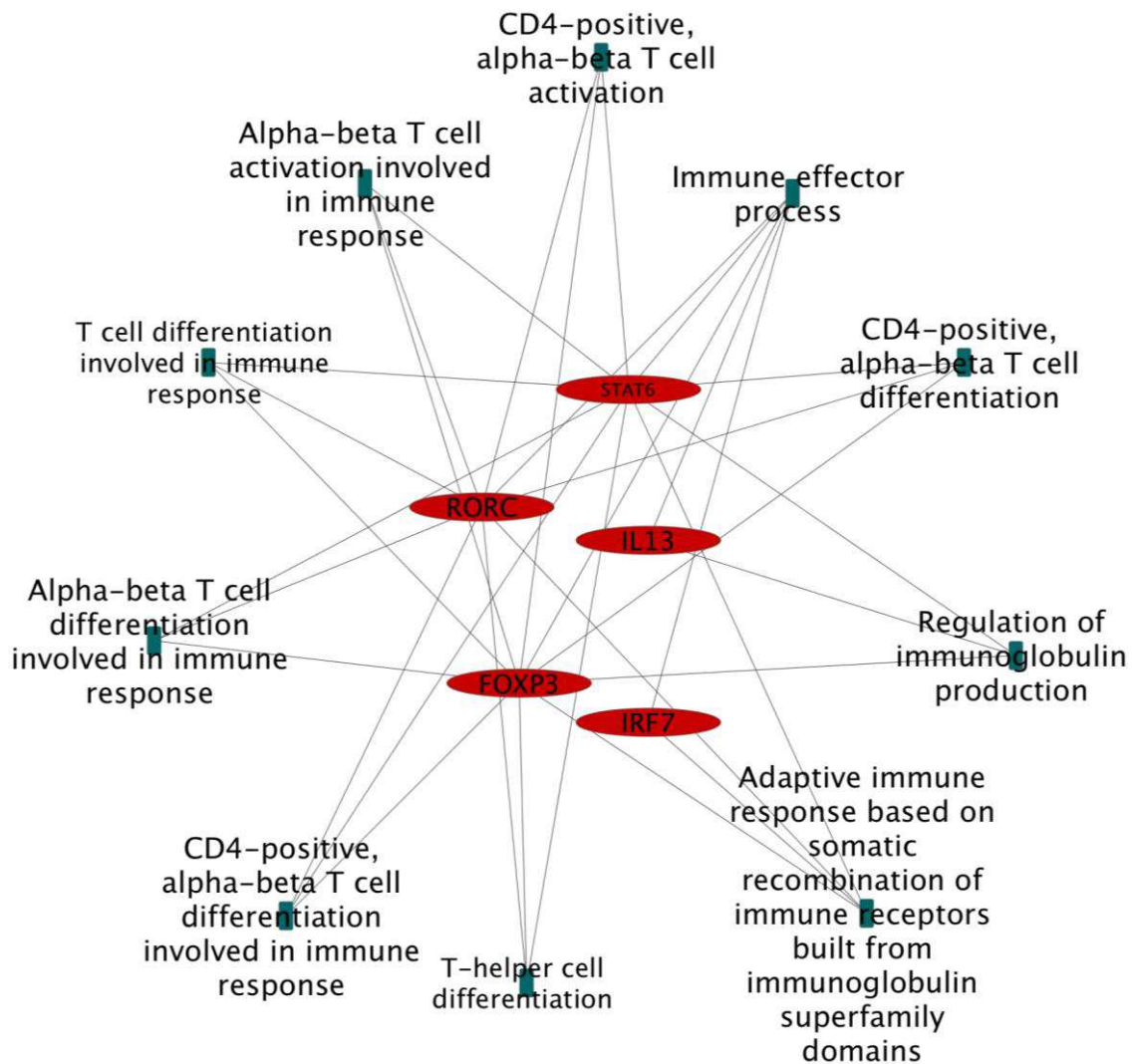
**Tabela 5.** Genes exclusivamente *up*-regulados em indivíduos do grupo não-caso e caso obtidos pela análise de z-score ( $z\ score > 0,5$ ).

Genes <i>up</i> -regulados	
Não caso	Caso
TLR4	STAT6
SCL11A1	FOXP3
IL18	IRF7
IL5	RORC
IFNGR1	IL13
RAG1	
CD8A	
CCL2	
C3	
TLR1	
MAPK8	
MAPK1	
LY96	
TLR3	
NFKB1	
IL10	
TLR2	
CCL5	
TLR5	
IL1B	
ICAM1	

Além disso, os genes *up*-regulados exclusivamente no grupo não caso também foram analisados quanto à rede de interação dos transcritos pela análise de enriquecimento de ontologia gênica (**Figura 24**). Diferentemente do perfil dos transcritos *up*-regulados no grupo caso, é possível observar que no grupo não caso os transcritos participam como componentes da ativação na resposta imune inata. A inespecificidade dos genes *up*-regulados nos processos biológicos foi reforçada pelas funções moleculares e componentes celulares que esses genes estão envolvidos como, por exemplo, sinalização celular e componente de membrana de uma resposta não específica a micro-organismos (**Quadro 3**).



**Figura 23: Rede de interação dos processos biológicos em que os transcritos positivamente expressos no grupo caso estão associados pela análise de Gene Ontology**



([bioinformatics.sdstate.edu/go/](http://bioinformatics.sdstate.edu/go/)).

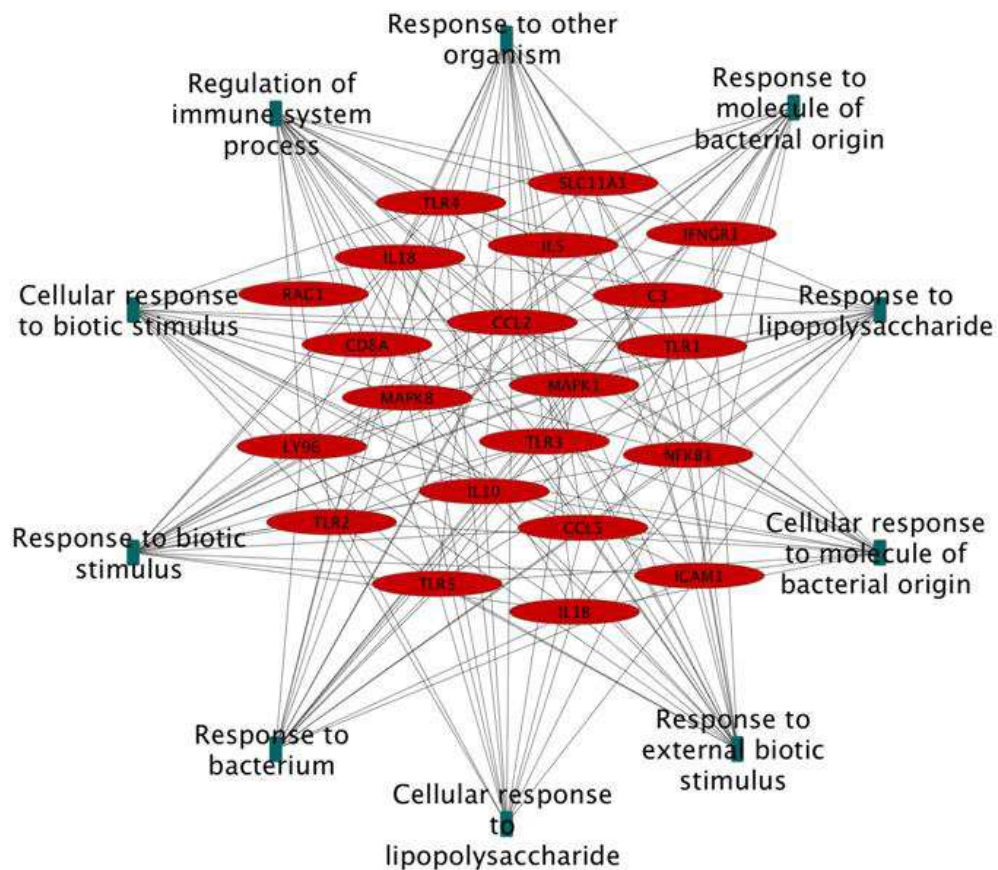
Esses resultados indicam que os indivíduos caso, quando em contato novamente com antígeno de *P. vivax*, podem reconhecer o parasito e iniciar a cascata de ativação de um perfil de resposta imune adaptativa.



**Quadro 2:** Componentes celulares e função molecular dos genes *up*-regulados em indivíduos caso.

	GO category	Genes
Cellular Component	RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Proximal promoter sequence-specific DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	RNA polymerase II regulatory region DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Sequence-specific double-stranded DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Regulatory region nucleic acid binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Double-stranded DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Transcription regulatory region DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Sequence-specific DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	DNA-binding transcription factor activity	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Transcription regulator activity	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	DNA binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Nucleic acid binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Transcription factor binding	IRF7 FOXP3 RORC STAT6
	Molecular Function	Nucleoplasm
Nuclear lumen		IRF7 FOXP3 RORC STAT6
Nuclear part		IRF7 FOXP3 RORC STAT6

**Figura 24.** Rede de interação dos processos biológicos dado pelo programa Gene Ontology para o grupo não caso.



**Quadro 3.** Componentes celulares e função molecular dos genes *up*-regulados em indivíduos não caso.

	GO category	Genes
Cellular Component	Extracellular region	ICAM1 C3 CCL2 IL1B TLR3 CCL5 IL5 IL10 IL18 CD8A LY96 MAPK1 NFKB1
	Extracellular space	ICAM1 C3 CCL2 IL1B TLR3 CCL5 IL10 IL18 IL5 LY96
	Endomembrane system	IL1B SLC11A1 TLR2 TLR1 TLR4 TLR3 MAPK1 NFKB1 C3 LY96
	Extracellular region part	ICAM1 C3 CCL2 IL1B TLR3 CCL5 IL10 IL18 IL5 LY96
	Plasma membrane part	ICAM1 TLR4 TLR2 CD8A TLR1 LY96 MAPK1 SLC11A1 IFNGR1 TLR3
	Whole membrane	TLR3 SLC11A1 TLR2 CD8A TLR1 ICAM1 MAPK1 TLR4 LY96
	Organelle membrane	TLR3 SLC11A1 TLR2 TLR1 TLR4 LY96
	Cell surface	ICAM1 CD8A TLR4 TLR2 C3
	Membrane region	TLR2 CD8A TLR1 ICAM1 MAPK1
	Membrane protein complex	TLR1 TLR4 TLR2 LY96 CD8A
	Cell projection	MAPK8 MAPK1 TLR2
	Extracellular organelle	ICAM1 C3 IL1B
	Side of membrane	CD8A TLR4 ICAM1
	Cell junction	ICAM1 MAPK1
	Cell-substrate junction	ICAM1 MAPK1
	Extracellular matrix	ICAM1 TLR3
	Cell body	MAPK1 TLR2
	Cell projection part	MAPK1 MAPK8
	Anchoring junction	ICAM1 MAPK1
	Neuron part	MAPK8 MAPK1
Plasma membrane region	CD8A MAPK1	
Molecular Function	Signaling receptor activity	IFNGR1 TLR4 TLR2 LY96 TLR3 TLR1 TLR5 CD8A ICAM1
	Molecular transducer activity	IFNGR1 TLR4 TLR2 LY96 TLR3 TLR1 TLR5 CD8A ICAM1
	Molecular function regulator	CCL2 IL1B CCL5 IL18 IL5 C3 IL10 MAPK8
	Receptor regulator activity	CCL2 IL1B CCL5 IL18 IL5 IL10
	Receptor ligand activity	CCL2 IL1B CCL5 IL18 IL5 IL10
	Transferase activity	MAPK1 MAPK8 CCL5 RAG1 CCL2
	Carbohydrate derivative binding	TLR4 TLR2 MAPK1 MAPK8 LY96
	Lipid binding	TLR4 TLR1 TLR2 LY96
	Protein-containing complex binding	ICAM1 IL1B CD8A TLR2
	Enzyme regulator activity	CCL5 C3 MAPK8
	Amide binding	TLR1 TLR4 TLR2
	Drug binding	MAPK1 MAPK8
	Hydrolase activity	CCL5 RAG1
	Small molecule binding	MAPK1 MAPK8

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Perfil da resposta de anticorpos IgM e IgG ao longo de 12 meses contra proteínas de *P. vivax* envolvidas no processo de invasão de reticulócitos (EBP2, DBPII e DEKnull-2) após curta e única exposição a esse parasito

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra *P. vivax* que possa contribuir no controle e eliminação da malária, encontra alguns desafios dada a complexidade biológica dessa espécie (ADAMS; MUELLER, 2017; MUELLER et al., 2013) e pela necessidade de melhor compreensão dos requisitos e mecanismos de desenvolvimento e a duração da resposta imune protetora contra os antígenos candidatos à vacina de *P. vivax*. Até o momento poucos estudos avaliaram a resposta imune à uma primeira exposição ao *P. vivax* (BRAGA; FONTES; KRETTLI, 1998; CERAVOLO et al., 2009), excluindo a influência de fatores como acúmulo de exposição, nível de transmissão de malária na área e infecções assintomáticas, que influenciam diretamente na aquisição e manutenção da resposta imune naturalmente adquirida (ANTONELLI et al., 2020; LONGLEY; SATTABONGKOT; MUELLER, 2016) que são de difícil controle em áreas endêmicas. Visto que estudos recentes sugerem que o uso de combinações de antígenos podem melhorar o efeito protetor (acima de 90%) de anticorpos contra antígenos vacinais, incluindo DBPII e EBP2, auxiliando na redução dos casos clínicos da malária pelo *P. vivax* (FRANÇA et al., 2017; HE et al., 2019), no presente estudo avaliamos a aquisição e a duração da resposta de anticorpos IgM e IgG contra esses potenciais antígenos candidatos à vacina de *P. vivax*, envolvidos na invasão de reticulócitos, (EBP2 e o imunógeno sintético da DBPII - DEKnull-2, epítomos conservados), além da proteína altamente imunogênica MSP1-19, em uma população exposta uma única vez a esse parasito.

Nossos resultados mostraram que uma única exposição ao *P. vivax* não foi suficiente para induzir anticorpos IgM significativos contra EBP2, DEKnull-2 ou DBPII. Em contrapartida, para MSP1-19, a resposta de anticorpos IgM apresentou o pico no momento do surto de malária, caindo progressivamente ao longo dos 12 meses; enquanto a resposta de anticorpos IgG foi menor inicialmente, mas atingindo mais de 90% de positividade aos 3 meses, permanecendo estável ao longo do acompanhamento. Esses resultados estão de acordo com a literatura onde é consenso que numa primo-infecção a um determinado patógeno, o primeiro isotipo de imunoglobulina a ser induzida para conter a infecção, é a IgM que, rapidamente cai após a fase aguda da doença, sendo precedido pela produção de IgG, anticorpo de maior

afinidade e associado a memória imunológica (KEYT et al., 2020; LIU et al., 2019; TOMARAS et al., 2008; WANG; COLIGAN; MORSE, 2016).

Nossos resultados mostraram ainda que uma única e rápida exposição ao *P. vivax* não foi suficiente para induzir anticorpos IgG contra EBP2, DBPII e DEKnull-2. No entanto, a proporção de respondedores para DEKnull-2 e DBPII aumentou após infecções de *P. vivax* recorrentes, sugerindo a necessidade de reexposição ao parasito para indução de anticorpos IgG antígeno-específico (efeito *booster*). Estes achados já eram esperados, uma vez que já é conhecida a dependência de acúmulo de exposição à malária para o desenvolvimento de uma resposta de anticorpos contra DBPII (COLE-TOBIAN et al., 2002; KANO et al., 2012; KING et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2010), possivelmente explicado pelo fato de que essa proteína só é exposta ao sistema imune do indivíduo no momento da invasão aos reticulócitos (ADAMS et al., 1990). Além disso, a maior frequência de respondedores com altos níveis de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC geralmente é encontrada em indivíduos com longa exposição à malária (CERÁVOLO et al., 2005; COLE-TOBIAN et al., 2002; KANO et al., 2012; KING et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2010). Vale ressaltar que nossos resultados mostram ainda que a resposta de anticorpos IgG para DEKnull-2 foi estável a partir de 3 meses ao passo que para DBPII a resposta oscilou; enquanto no sexto mês apenas 25% dos indivíduos permaneceram com anticorpos detectáveis contra DBPII, 75% ainda eram positivos para DEKnull-2. Esses resultados com DEKnull-2 reforçam seu potencial, pois já foi demonstrado que os anticorpos contra DBPII adquiridos naturalmente tendem a ser de curta duração e variante-específica (CERAVOLO et al., 2009; COLE-TOBIAN et al., 2009). Além disso, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que a resposta de anticorpos IgG contra DEKnull-2 em indivíduos com longa exposição à malária da Amazônia brasileira, são estáveis, apresentando também níveis de IgG superiores comparados com DBPII (MEDEIROS et al., 2020; NTUMNGIA et al., 2017; PIRES et al., 2018). Inclusive, foi observada associação entre a resposta de anticorpos IgG contra DEKnull-2 e anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs) (ALVES et al., 2021), estando altos níveis de BIAbs associados a proteção clínica (KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016). Portanto, nossos achados reforçam o potencial da DEKnull-2 como candidato à vacina contra *P. vivax*.

De forma inesperada, não foi possível detectar anticorpos IgG contra EBP2 mesmo após infecções de *P. vivax* recorrentes, como observamos para DBPII/DEKnull-2. Embora as razões para a ausência do efeito *booster* sobre a resposta de anticorpos IgG contra a EBP2 em

primoinfectados de *P. vivax* não sejam conhecidas, especulou-se a possibilidade da influência de polimorfismos no gene *ebp2*, já que um estudo conduzido em amostras do Sudeste Asiático sugeriu que a região II da EBP2 é altamente polimórfica (HAN et al., 2020). No entanto, para os nossos dados o polimorfismo no gene *ebp2* não parece explicar a baixa imunogenicidade da EBP2, já que o alelo *ebp2* do surto de *P. vivax* apresentou alta identidade com o isolado referência C127 (HESTER et al., 2013) utilizado neste estudo como proteína recombinante para detecção de anticorpos. Os dois isolados diferiram apenas por um único polimorfismo de nucleotídeo (G1057A), uma mutação não sinônima na posição 353 da proteína (E353K).

Uma explicação mais plausível para a baixa imunogenicidade da EBP2 nos indivíduos primoinfectados pelo *P. vivax* pode estar relacionada à especificidade da célula hospedeira, como demonstrado por Ntumngia e colaboradores (2016), onde as características da ligação da EBP2 nos reticulócitos são muito mais restritas comparado à DBPII. A proteína EBP2 se liga preferencialmente em reticulócitos *Duffy* positivos muito jovens ( $CD71^{high}$ ) geralmente localizados na medula óssea (PARMLEY; HAJDU; DENYS, 1983). Outra explicação que pode contribuir para a baixa imunogenicidade da EBP2 é que a invasão de reticulócitos pelos *Plasmodium* spp leva menos de um minuto (COWMAN et al., 2017; DVORAK et al., 1975; WEISS; CRABB; GILSON, 2016), e assim como outros membros da família DBL, a EBP2 pode ser liberada e exposta ao sistema imune por um curto período (ADAMS et al., 1990; COWMAN; CRABB, 2006; SINGH et al., 2006). Dessa forma, múltiplas infecções por *P. vivax* são necessárias para induzir uma resposta de anticorpos específica e significativa. De fato, esta evidência suporta nossos achados de baixa imunogenicidade a EBP2 após uma primeira infecção por *P. vivax* seguida por um alto reconhecimento após exposição prolongada à malária na região da Amazônia, onde a frequência da resposta de IgG contra a EBP2 variou de 35% a 92%, conforme o número prévio de episódios de malária.

A baixa imunogenicidade da EBP2 também foi descrita anteriormente em crianças da PNG, onde os níveis totais de IgG variaram de 4,0% a 16,5% atingindo >25% e >5% dos níveis de adultos hiperimunes, respectivamente (HE et al., 2019). No entanto, os níveis de anti-EBP2 foram positivamente correlacionados com a idade e exposição cumulativa (HE et al., 2019). Alta frequência de respondedores IgG para EBP2 foi demonstrada em primatas neotropicais, onde a soropositividade foi maior em animais de vida livre quando comparados com os de cativeiro, sugerindo que a exposição intensa à picada de mosquito pode levar a alta frequência de resposta de anticorpos IgG contra essa proteína (ASSIS et al., 2021). Além disso, em estudo preliminar do nosso grupo, mostrou que indivíduos residentes de área endêmica com longa

exposição à malária apresentaram 60% de frequência de anticorpos IgG contra a EBP2, o qual, foi estável no período de 7 anos de acompanhamento (TORRES, 2017). Em adição, nossos achados são reforçados, uma vez que a variável relacionada à exposição cumulativa foi associada ao risco de ter anticorpos específicos contra os ligantes de *P. vivax*.

Nossos resultados contribuem para validar o potencial do imunógeno DEKnull-2, construído para contornar a limitação da DBPII devido aos polimorfismos na região do ligante. Além disso, mostra que a resposta de anticorpos naturalmente contra a EBP2 é adquirida mais lentamente. Considerando que a combinação de anticorpos EBP2/DBPII foi associada a um risco reduzido de doença clínica (FRANÇA et al., 2017; HE et al., 2019) mais estudos funcionais se fazem necessários para avaliar a capacidade dos anticorpos IgG contra EBP2 bloquear a invasão de reticulócitos de *P. vivax* podendo assim ser incluído em uma combinação vacinal usando proteínas de estágio sanguíneo contra esse parasito.

## **6.2 Estabelecimento de memória imunológica de longa duração aos antígenos relacionados à invasão pelo *P. vivax* após exposição única**

A compreensão do desenvolvimento e manutenção da memória imunológica de vida longa é o principal foco dos estudos direcionados para o desenvolvimento de vacinas, principalmente direcionadas para vacinas baseada em antígenos de fase sanguínea de *Plasmodium spp* que visam a produção de anticorpos neutralizantes (BEESON et al., 2019; HOFFMAN et al., 2015; MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015). Na malária causada pelo *P. vivax* estudos direcionados para a compreensão dos fatores e mecanismos envolvidos no estabelecimento da imunidade humoral naturalmente adquirida de vida longa ainda são escassos, principalmente em população sob única exposição, onde excluem-se a influência de infecções prévias, e reações cruzadas conferidas pela coinfeção entre as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* (GNIDEHOU et al., 2018; MITRAN et al., 2019).

Nesta parte do estudo, avaliamos a duração da imunidade naturalmente adquirida (anticorpos e células B de memória) contra os antígenos de *P. vivax* DBPII, DEKnull-2, e MSP1-19 após 13 anos da exposição a esse parasito. Os nossos resultados mostram que não foi possível manter níveis de anticorpos antígeno-específicos detectáveis após 13 anos da exposição única ao *P. vivax*, até mesmo contra a MSP1-19. A ausência de anticorpos detectáveis contra MSP1-19, contrasta com os observados por Braga e colaboradores (1998) que

descreveram uma frequência de anticorpos IgG de 47% após 7 anos o surto de malária ocorrido em uma comunidade rural de Minas Gerais. Este menor tempo para avaliação dos anticorpos (7 anos) pode explicar a presença de anticorpos em indivíduos expostos ao surto avaliado por Braga e colaboradores (1998) em comparação com o nosso. Além disso, no surto registrado em Sousa, os indivíduos receberam tratamento rápido, o que não permitiu que fosse observado altas parasitemias e longa exposição do parasito ao sistema imune. No entanto, corrobora com os dados que demonstraram que imunidade naturalmente adquirida contra a maioria dos antígenos do parasito da malária é de vida curta (AKPOGHENETA et al., 2008; CROMPTON et al., 2010) e estabelecida após repetidas exposições ao parasito, sendo perdida na ausência de reexposição (LANGHORNE et al., 2008; MARSH; KINYANJUI, 2006). O rápido declínio ou a ausência completa dos níveis de anticorpos contra as proteínas da fase sanguínea do parasito sugerem estabelecimento deficiente das células B de memória (MBCs) ou de células plasmáticas de vida longa (LANGHORNE et al., 2008), uma vez que essas células são responsáveis pela produção de anticorpos (INOUE; SHINNAKASU; KUROSAKI, 2022; PÉREZ-MAZLIAH et al., 2020).

No presente estudo, MBCs específicas para DBPII, DEKnull-2 e MSP1-19 foram diferenciadas em células secretoras de anticorpos (ASCs) no grupo exposto (caso e não caso) após 13 anos, um longo período sem reexposição ao parasito, o que indica que MBCs contra antígenos de *P. vivax* foram induzidas pela única e rápida exposição a esse parasito. Esta conclusão é possível, uma vez esses indivíduos residentes de área não endêmica, não viajaram e/ou tiveram risco de infecção malárica após o surto de *P. vivax*. Resultados semelhantes foram mostrados em viajantes que retornaram da África com malária e, embora níveis de anticorpos específicos não foram mais detectáveis após 16 anos da exposição, MBCs específicas para MSP1 de *P. falciparum* foram detectadas (NDUNGU et al., 2013). Outros estudos realizados em menores tempo de acompanhamento relacionado ao *P. vivax*, também demonstraram resultados semelhantes, onde foi observada baixa resposta de anticorpos séricos com detecção de MBCs antígeno-específicas (CHANGROB et al., 2018; KOCHAYOO et al., 2019a, 2019b; WIPASA et al., 2010). Mais especificamente, foi observada redução da positividade da resposta de anticorpos contra DBPII, aos 3 anos sem reexposição ao *P. vivax*, mas 95% (18/19) dos indivíduos apresentaram MBCs específicas (CHANGROB et al., 2018). Em nosso trabalho, após 13 anos sem reexposição ao *P. vivax*, ainda foi possível detectar MBCs específicas em 33% dos indivíduos que tiveram malária aguda por esse parasito. Um outro estudo também mostrou que a resposta de anticorpos contra proteínas de roptria de *P. vivax* (RALP1 e RhopH2)

não foram mais detectados após 18 meses, no entanto, em 70% dos indivíduos MBCs antígeno-específicas foram detectadas (KOCHAYOO et al., 2019b).

No nosso trabalho, a maior proporção de ASCs específicas, encontrada foi obtida para MSP1-19 comparado a DBPII e DEKnull-2, o que era esperado, já que a MSP1-19 foi a proteína mais imunogênica entre as avaliadas (DBPII, DEKnull-2) ao longo de 12 meses. Os maiores níveis de ASCs específicas foram observados para DEKnull-2 quando comparado a DBPII, reforçando o potencial da DEKnull-2 como imunógeno sintético baseado em DBPII. Nenhum outro estudo, avaliou a resposta de MBCs principalmente de longa duração específicas para DEKnull-2, conhecimento esse de suma importância no desenvolvimento de uma vacina. Em conjunto, esses resultados apontam que a avaliação de anticorpos ou MBCs de forma isolada pode não refletir a resposta imune contra a malária. Contudo, o entendimento da reativação dessas células e sua participação frente a uma reexposição ao parasito necessitam de mais estudos para serem elucidados.

Em nossos resultados não era esperado que indivíduos do grupo exposto não caso apresentassem resposta de ASCs antígeno-específica positiva. No entanto, um indivíduo não caso apresentou anticorpos IgM e ASCs detectáveis para os antígenos avaliados. Esses achados sugerem que exposição ao *P. vivax* possam ter ocorrido de forma assintomática, embora não sejam comum essa forma de apresentação clínica em indivíduos sem exposição prévia, como no presente estudo. No entanto, não podemos desconsiderar a presença de mecanismos inatos de resistência à malária como, por exemplo, anemia falciforme e talassemia (ALLEN et al., 1997; TEO; WONG, 1985), que não foram avaliados na nossa população de estudo.

Visto que indivíduos expostos uma única vez ao *P. vivax* são capazes de produzir e manter MBCs específicas, o próximo passo foi avaliar quais as subpopulações de MBCs envolvidas na resposta de longa duração contra DBPII e DEKnull-2. No entanto, após cinco dias sob estímulo com ambas as proteínas com PBMCs dos grupos expostos (caso, não caso) e não exposto, nenhuma alteração significativa no balanço entre as subpopulações de células B avaliadas foi observada, incluindo as MBCs ou células plasmáticas. Esses resultados contrastam com os encontrados por JOYNER e colaboradores (2019) que observaram um aumento nas células B diferenciadas (*Switched IgG+*) e níveis de anticorpos circulantes séricos em primatas não humanos infectados com *P. cynomolgi* sob reexposição (recaídas e reinfeções homólogas) que foram associados com redução dos sintomas.



Apesar de não termos observado aumento significativo das subpopulações de células B em nossos experimentos, o que pode ser explicado pela baixa frequência de MBCs específicas circulantes após ausência prolongada de exposição ao *P. vivax*, a correlação entre a resposta de anticorpos, MBCs antígeno-específicas (ELISpot) e subpopulação de células B (imunofenotipagem) indicou uma tendência de correlação positiva entre anticorpos IgG e MBCs IgG<sup>+</sup> e MBCs IgM<sup>+</sup>. Mais especificamente, o perfil de correlação com a DBPII foi associado as MBCs atípicas expressando IgM, enquanto para DEKnull-2 foi associado com MBCs clássicas (IgG<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup>) e células plasmáticas. Interessantemente um trabalho anterior do nosso grupo avaliou a relação entre a resposta de IgM contra DBPII e DEKnull-2 naturalmente adquirida e o perfil de atividade de anticorpos IgG/BIAbs em um população da Amazônia brasileira, mostrando que exposição prolongada à malária em área de transmissão instável e baixa, direcionou uma resposta de IgM estável para DBPII (epítomos específicos de variantes), enquanto as respostas de IgG foram associadas com o imunógeno DEKnull-2 (epítomos conservados) (MEDEIROS et al., 2020). Além disso, a resposta de IgG contra DEKnull-2 foi associada a resposta de BIAbs, ou seja, capazes de bloquear a interação DBPII-DARC (ALVES et al., 2021), que estão associados a proteção clínica (KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016). No nosso estudo, anticorpos contra DBPII tiveram correlação positiva com as MBCs atípicas. No entanto, o papel das MBCs atípicas na malária não ainda está claro. Os estudos mostraram que as MBCs atípicas tem reduzida expressão de IgG na sua superfície celular, baixa taxa de proliferação e aumento de expressão de receptores inibitórios que podem comprometer o funcionamento correto do receptor de células B (BCR) (PORTUGAL et al., 2015; SULLIVAN et al., 2015), o que poderia justificar uma resposta de anticorpos não estável, diferente da DEKnull-2, onde anticorpos tiveram correlação significativa com as MBCs clássicas e células plasmáticas. Assim, nossos resultados sugerem que a proteína DEKnull-2 pode ser mais eficiente na indução de uma resposta de anticorpos neutralizantes e no estabelecimento de MBCs comparado a DBPII. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel das MBCs atípicas na malária.

Ainda neste trabalho, realizamos um experimento piloto para avaliar o perfil da expressão diferencial de genes relacionados à imunidade inata e adaptativa sob estímulo com DBPII nos indivíduos casos e não-caso, para compreender os fatores associados com a resposta imune de longa duração. Embora ainda preliminar foi possível identificar cinco fatores de transcrição diferencialmente expressos positivamente (*up-regulados*) nos dois grupos estudados

(caso e não caso). O perfil de genes diferentemente expressos positivamente em PBMC estimulados com DBPII do grupo não-caso, foram associados a processos biológicos inespecíficos que estariam ativando principalmente mecanismos da resposta imune inata. No entanto, o perfil de genes *up*-regulados nos indivíduos que tiveram infecção pelo *P. vivax*, (STAT6, FOXP3, IRF7, RORF e IL-13) estão envolvidos na ativação e diferenciação de células T CD4<sup>+</sup>, regulação da produção e recombinação de imunoglobulinas, descritos como fatores envolvidos em via de ativação da resposta imune adaptativa (CROTTY, 2014; DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014; INOUE; SHINNAKASU; KUROSAKI, 2022). Em acordo com os nossos resultados, um estudo de persistência de MBCs específicas para DBPII após 8 a 10 semanas pós infecção pelo *P. vivax*, identificou um aumento dos níveis de IFN-gama, IL-10, IL-2 e frequência de células CD4<sup>+</sup> (CHANGROB et al., 2015). Com base nos resultados preliminares, nos futuros estudos a inclusão da avaliação de resposta de células T CD4<sup>+</sup> são necessários para melhor entendimento da resposta imune adquirida contra o *P. vivax*.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A EBP2 é pouco imunogênica após única e rápida exposição ao *P. vivax*, mas altamente imunogênica sob longa exposição;
- Infecções de *P. vivax* recorrentes melhoram a resposta de anticorpos IgG contra DEKnull-2 e DBPII,
- A resposta de anticorpos IgG DEKnull-2 é mais estável o que reforça o potencial como candidato vacinal;
- Anticorpos IgG antígeno-específicos não são mais detectáveis após 13 anos da exposição ao *P. vivax*, diferentemente das MBCs antígeno-específicas
- Genes diferentemente expressos em indivíduos que tiveram infecção pelo *P. vivax* (caso) estão relacionados à imunidade adaptativa.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, J. H. et al. The duffy receptor family of plasmodium knowlesi is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell**, v. 63, n. 1, p. 141–153, 1990.
- ADAMS, J. H. et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Microbiology**, v. 89, n. August, p. 7085–7089, 1992.
- ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The Biology of Plasmodium vivax. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 9, p. a025585, set. 2017.
- AKPOGHENETA, O. J. et al. Duration of Naturally Acquired Antibody Responses to Blood-Stage Plasmodium falciparum Is Age Dependent and Antigen Specific. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1748–1755, abr. 2008.
- ALAGANAN, A.; SINGH, P.; CHITNIS, C. E. Molecular mechanisms that mediate invasion and egress of malaria parasites from red blood cells. **Current Opinion in Hematology**, v. 24, n. 3, p. 208–214, 2017.
- ALLEN, S. J. et al. +-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 26, p. 14736–14741, 23 dez. 1997.
- ALMEIDA, G. G. et al. Asymptomatic Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: Submicroscopic parasitemic blood infects Nyssorhynchus darlingi. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 10, p. e0009077, 29 out. 2021.
- ALVES, J. R. S. et al. Multiplexed Microsphere-Based Flow Cytometric Assay to Assess Strain Transcending Antibodies to Plasmodium vivax Duffy Binding Protein II Reveals an Efficient Tool to Identify Binding-Inhibitory Antibody Responders. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 5 out. 2021.
- AMARAL, L. C. et al. Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 154, 30 dez. 2019.
- AMON, J. et al. EVIDENCE FOR TRANSMISSION OF PLASMODIUM VIVAX AMONG A DUFFY ANTIGEN NEGATIVE POPULATION IN WESTERN KENYA. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 575–581, 1 out. 2006.
- ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 5, p. 220–227, 2009.
- ANTONELLI, L. R. et al. The immunology of Plasmodium vivax malaria. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 163–189, 2020.
- ARAMA, C. et al. Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a Broad Array of Plasmodium falciparum Antigens. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. ofv118, set. 2015.
- ASSIS, G. M. P. DE et al. Profiling Humoral Immune Response Against Pre-Erythrocytic and Erythrocytic Antigens of Malaria Parasites Among Neotropical Primates in the Brazilian Atlantic Forest. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–15, 2021.
- BEESON, J. G. et al. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 3, p. 343–372, 2016.
- BEESON, J. G. et al. Challenges and strategies for developing efficacious and long-lasting

- malaria vaccines. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 474, 2019.
- BENNETT, J. W. et al. Phase 1/2a Trial of Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004423, 26 fev. 2016.
- BENTES, A. A.; COSTA, G. A.; TEIXEIRA, D. C. Malaria Update. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, p. 53–56, 2018.
- BOURGARD, C. et al. Plasmodium vivax biology: Insights provided by genomics, transcriptomics and proteomics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. FEB, 2018.
- BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and Infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 377–410, abr. 2011.
- BOYLE, M. J. et al. Human antibodies fix complement to inhibit plasmodium falciparum invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 580–590, 2015.
- BOYLE, M. J. et al. IgM in human immunity to Plasmodium falciparum malaria. **Science Advances**, v. 5, n. 9, p. eaax4489, 25 set. 2019.
- BRAGA, É. M.; FONTES, C. J. |F.; KRETTLI, A. U. Persistence of Humoral Response against Sporozoite and Blood-Stage Malaria Antigens 7 Years after a Brief Exposure to Plasmodium vivax . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 4, p. 1132–1135, 1998.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017.
- BRETSCHER, P.; COHN, M. A Theory of Self-Nonself Discrimination: Paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively. **Science**, v. 169, n. 3950, p. 1042–1049, 11 set. 1970.
- CARIAS, L. L. et al. Identification and Characterization of Functional Human Monoclonal Antibodies to Plasmodium vivax Duffy-Binding Protein. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 9, p. 2648–2660, 1 maio 2019.
- CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2019.
- CAVASINI, C. E. et al. Plasmodium vivax infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 10, p. 1042–1044, out. 2007.
- CERAVOLO, I. P. et al. Inhibitory Properties of the Antibody Response to Plasmodium vivax Duffy Binding Protein in an Area with Unstable Malaria Transmission. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, n. 3, p. 270–278, mar. 2008.
- CERAVOLO, I. P. et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 3, p. 502–510, 2009.
- CERÁVOLO, I. P. et al. Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 675–681, 2005.
- CERBINO, V. et al. **Evolução e Controle do Surto de malária por Plasmodium vivax em**

**Rio Mando, Minas Gerais -2003.** Belo Horizonte: [s.n.].

CHAN, J.-A.; FOWKES, F. J. I.; BEESON, J. G. Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 19, p. 3633–3657, 2 out. 2014.

CHANGROB, S. et al. Naturally-acquired cellular immune response against Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 paralog antigen. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2015.

CHANGROB, S. et al. Persistence of Long-lived Memory B Cells specific to Duffy Binding Protein in individuals exposed to Plasmodium vivax. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8347, 29 dez. 2018.

CHARLES, E. D. et al. Clonal expansion of immunoglobulin M+CD27+ B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1344–1356, 2008.

CHAVES, K. M. et al. Malária em Minas Gerais, Brasil, no período 1980-1992. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 4, p. 621–623, dez. 1995.

CHEN, N. et al. Relapses of Plasmodium vivax Infection Result from Clonal Hypnozoites Activated at Predetermined Intervals. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 7, p. 934–941, abr. 2007.

CHITNIS, C. E.; MILLER, L. H. Identification of the erythrocyte binding domains of plasmodium vivax and plasmodium knowlesi proteins involved in erythrocyte invasion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 2, p. 497–506, 1994.

CHOOTONG, P. et al. Mapping epitopes of the Plasmodium vivax Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1089–1095, 2010.

CHOOTONG, P. et al. Characterization of inhibitory anti-duffy binding protein II immunity: Approach to plasmodium vivax vaccine development in Thailand. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–7, 2012.

COHEN, S.; BUTCHER, G. A.; CRANDALL, R. B. Action of Malarial Antibody in vitro. **Nature**, v. 223, n. 5204, p. 368–371, jul. 1969.

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria. **Nature**, v. 192, n. 4804, p. 733–737, nov. 1961.

COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. sexta edição. [s.l.] Guanabara Koogan, 2009.

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

COLE-TOBIAN, J. L. et al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous Plasmodium vivax strains in Papua New Guinean children. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 4009–4017, 2009.

COLE-TOBIAN, J. L. et al. Age-Acquired Immunity to a Plasmodium vivax Invasion Ligand, the Duffy Binding Protein. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 4, p. 531–539, 2002.

COWMAN, A. F. et al. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016.

COWMAN, A. F. et al. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. **Cell Host and Microbe**, v. 22, n. 2, p. 232–245, 2017.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v.

124, n. 4, p. 755–766, fev. 2006.

CROMPTON, P. D. et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 15, p. 6958–6963, 2010.

CROMPTON, P. D. et al. Malaria Immunity in Man and Mosquito: Insights into Unsolved Mysteries of a Deadly Infectious Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 157–187, 2014.

CROTTY, S. T. Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. **Immunity**, v. 41, n. 4, p. 529–542, out. 2014.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, v. 20, n. 3–4, p. 385–396, 2001.

CURTSINGER, J. M.; MESCHER, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 333–340, jun. 2010.

CYSTER, J. G.; ALLEN, C. D. C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. **Cell**, v. 177, n. 3, p. 524–540, 2019.

DE ALVARENGA, D. A. M. et al. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 86, 8 dez. 2018.

DE PINA-COSTA, A. et al. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–633, 2014.

DE, S. L. et al. Progress towards the development of a *P. vivax* vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 20, n. 2, p. 97–112, 2021.

DE SILVA, N. S.; KLEIN, U. Dynamics of B cells in germinal centres. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 137–148, 2015.

DE SOUSA, T. N. et al. The duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: Lessons from the Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 608–617, 2014.

DEN HAAN, J. M. M.; ARENS, R.; VAN ZELM, M. C. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. **Immunology Letters**, v. 162, n. 2, p. 103–112, dez. 2014.

DOGAN, I. et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. **Nature Immunology**, v. 10, n. 12, p. 1292–1299, 25 dez. 2009.

DVORAK, J. A. et al. Invasion of Erythrocytes by Malaria Merozoites. **Science**, v. 187, n. 4178, p. 748–750, 28 fev. 1975.

EHRHARDT, G. R. A. et al. Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 6, p. 783–791, 19 set. 2005.

FERREIRA, M. U. et al. Monitoring *Plasmodium vivax* resistance to antimalarials: Persisting challenges and future directions. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 15, n. October 2020, p. 9–24, 2021.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016.

- FIGUEIREDO, M. M. et al. T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 7, p. e1006484, 10 jul. 2017.
- FONTES, C. C. J.; BATHURST, I.; KRETTLI, A. U. *Plasmodium vivax* sporozoite antibodies in individuals exposed during a single malaria outbreak in a non-endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 1, p. 28–33, 1991.
- FOWKES, F. J. I.; BOEUF, P.; BEESON, J. G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. **Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 139–153, 7 fev. 2016.
- FRANÇA, C. T. et al. Identification of Highly-Protective combinations of *plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. **eLife**, v. 6, p. 1–22, 2017.
- GENTON, B. et al. *Plasmodium vivax* and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. e127, 17 jun. 2008.
- GNIDEHOU, S. et al. Cross-Species Immune Recognition Between *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Antibodies and the *Plasmodium falciparum* Surface Antigen VAR2CSA. **The Journal of Infectious Diseases**, 26 jul. 2018.
- GOLASSA, L. et al. The biology of unconventional invasion of Duffy-negative reticulocytes by *Plasmodium vivax* and its implication in malaria epidemiology and public health. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2020.
- GRIFFING, S. M. et al. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 701–718, set. 2015.
- GUEIRARD, P. 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**, v. 107, n. 43, p. 18640–18645, 2010.
- GUNALAN, K. et al. Role of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein 1 in invasion of Duffy-null Africans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 22, p. 6271–6276, 2016.
- HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 297–316, 2011.
- HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HAN, J. H. et al. Genetic diversity and neutral selection in *Plasmodium vivax* erythrocyte binding protein correlates with patient antigenicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1–16, 2020.
- HANS, D. et al. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1423–1434, 21 jan. 2005.
- HE, W.-Q. et al. Antibody responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical Malaria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0006987, 15 fev. 2019.
- HESTER, J. et al. De Novo Assembly of a Field Isolate Genome Reveals Novel *Plasmodium vivax* Erythrocyte Invasion Genes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013.
- HOFFMAN, S. L. et al. The March Toward Malaria Vaccines. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 49, n. 6, p. S319–S333, 2015.



- HOLLA, P. et al. Exhaustion may not be in the human B cell vocabulary, at least not in malaria. **Immunological Reviews**, p. imr.12809, 25 set. 2019.
- HOLLINGDALE, M. R. et al. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 132, n. 2, p. 909–13, fev. 1984.
- HOLZ, L. E.; FERNANDEZ-RUIZ, D.; HEATH, W. R. Protective immunity to liver-stage malaria. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 10, p. e105, 2016.
- ILLINGWORTH, J. et al. Chronic Exposure to *Plasmodium falciparum* Is Associated with Phenotypic Evidence of B and T Cell Exhaustion. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 1038–1047, 2013.
- IMWONG, M. et al. Relapses of *Plasmodium vivax* Infection Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 7, p. 927–933, abr. 2007.
- INOUE, T.; SHINNAKASU, R.; KUROSAKI, T. Generation of High Quality Memory B Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. January, p. 1–10, 2022.
- JAHNMATZ, M. et al. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. **Journal of Immunological Methods**, v. 391, n. 1–2, p. 50–59, 2013.
- JOYNER, C. J. et al. **Humoral immunity prevents clinical malaria during Plasmodium relapses without eliminating gametocytes.** [s.l: s.n.]. v. 15
- KANO, F. S. et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: Baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 8, p. 989–1000, 2012.
- KANO, F. S. et al. The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–21, 2016.
- KARNOWSKI, A. et al. B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 11, p. 2049–2064, 22 out. 2012.
- KEARNEY, J. F. Development and Function of B Cell Subsets. **Molecular Biology of B Cells**, p. 99–119, 2014.
- KEPPLE, D. et al. Alternative invasion mechanisms and host immune response to *Plasmodium vivax* malaria: Trends and future directions. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2021.
- KEYT, B. A. et al. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. **Antibodies**, v. 9, n. 4, p. 53, 13 out. 2020.
- KING, C. L. et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8363–8368, 17 jun. 2008.
- KOCH, R. Professor Koch's Investigations on Malaria: Fourth Report to the Colonial Department of the German Colonial Office. **British medical journal**, v. 1, n. 2061, p. 1597–8, 30 jun. 1900.
- KOCHAYOO, P. et al. The acquisition of long-lived memory B cell responses to merozoite surface protein-8 in individuals with *Plasmodium vivax* infection. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019a.

- KOCHAYOO, P. et al. The persistence of naturally acquired antibodies and memory B cells specific to rhoptry proteins of *Plasmodium vivax* in patients from areas of low malaria transmission. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2019b.
- KRISHNAMURTY, A. T. et al. Somatic Hypermutated Plasmodium-Specific IgM+ Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 402–414, 2016.
- KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 1, 1985.
- KUROSAKI, T.; KOMETANI, K.; ISE, W. Memory B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 149–159, 13 mar. 2015.
- LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 725–732, jul. 2008.
- LIM, K. J. et al. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*. **Parasitology Research**, v. 92, n. 5, p. 384–389, 2004.
- LIMA-JUNIOR, J. DA C.; PRATT-RICCIO, L. R. Major histocompatibility complex and malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JAN, p. 1–13, 2016.
- LIMONGI, J. E. et al. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 232–237, 2008.
- LIU, J. et al. Role of the IgM Fc Receptor in Immunity and Tolerance. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 22 mar. 2019.
- LONGLEY, R. J.; SATTABONGKOT, J.; MUELLER, I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. **Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 154–170, 2016.
- MACLENNAN, I. C. M. Germinal Centers. **Annual Review of Immunology**, v. 12, n. 1, p. 117–139, abr. 1994.
- MAITLAND, K. et al. The interaction between *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in children on Espiritu Santo island, Vanuatu. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 614–620, nov. 1996.
- MALKIN, E. M. et al. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine**, v. 23, n. 24, p. 3131–3138, maio 2005.
- MARCHESINI, P. et al. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 1\_suppl, p. 97–106, 1 jan. 2001.
- MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 1–2, p. 51–60, 2006.
- MEDEIROS, C. M. P. et al. Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, p. 1–16, 2020.
- MEIBALAN, E.; MARTI, M. Biology of Malaria Transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 3, p. a025452, mar. 2017.
- MELO, J. O. et al. Evaluation of the malaria elimination policy in Brazil: a systematic review and epidemiological analysis study. **Tropical biomedicine**, v. 37, n. 2, p. 513–535, jun. 2020.
- MENARD, D. et al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-

- negative Malagasy people. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5967–5971, 30 mar. 2010.
- MICHON, P. et al. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 997–1008, 2007.
- MIGOT, F. et al. Anti-malaria antibody-producing B cell frequencies in adults after a *Plasmodium falciparum* outbreak in Madagascar. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 102, n. 3, p. 529–534, 2008.
- MILLER, L. H. et al. The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 6, p. 302–304, 1976.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico de malária**. 2020. ed. Brasília: [s.n.].
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico Malária** 2021. p. 99, 2021.
- MITRAN, C. J. et al. Antibodies to Cryptic Epitopes in Distant Homologues Underpin a Mechanism of Heterologous Immunity between *Plasmodium vivax* PvDBP and *Plasmodium falciparum* VAR2CSA. **mBio**, v. 10, n. 5, 29 out. 2019.
- MOIR, S. et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 8, p. 1797–1805, 2008.
- MOORMANN, A. M.; NIXON, C. E.; FORCONI, C. S. Immune effector mechanisms in malaria: An update focusing on human immunity. **Parasite Immunology**, n. April, p. 1–14, 2019.
- MUELLENBECK, M. F. et al. Atypical and classical memory B cells produce *Plasmodium falciparum* neutralizing antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 389–399, 2013.
- MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–66, set. 2009.
- MUELLER, I. et al. **Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*. Epidemiological Observations and Potential Targets**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 81
- MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7489–7495, 2015.
- NARDIN, E. et al. Pre-erythrocytic malaria vaccine: mechanisms of protective immunity and human vaccine trials. **Parassitologia**, v. 41, n. 1–3, p. 397–402, set. 1999.
- NDUNGU, F. M. et al. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 21, p. 8247–8252, 2012.
- NDUNGU, F. M. et al. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 11, p. 2919–2929, 2013.
- NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 11 dez. 2011.
- NICOLETE, V. C. et al. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 10, p. 1539–1546, 15 nov. 2016.
- NIELSEN, S. C. A.; BOYD, S. D. New technologies and applications in infant B cell

immunology. **Current Opinion in Immunology**, v. 57, p. 53–57, abr. 2019.

NÓBREGA DE SOUSA, T.; CARVALHO, L. H.; ALVES DE BRITO, C. F. Worldwide Genetic Variability of the Duffy Binding Protein: Insights into Plasmodium vivax Vaccine Development. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e22944, 2 ago. 2011.

NOGARO, S. I. et al. The breadth, but not the magnitude, of circulating memory B cell responses to *P. falciparum* increases with age/exposure in an area of low transmission. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

NTUMNGIA, F. B. et al. A novel erythrocyte binding protein of Plasmodium vivax suggests an alternate invasion pathway into duffy-positive reticulocytes. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2016.

NTUMNGIA, F. B. et al. An engineered vaccine of the Plasmodium vivax Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13779, 23 dez. 2017.

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

O'DONNELL, R. A. et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-119 are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 12, p. 1403–1412, 2001.

OBENG-ADJEI, N. et al. Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. **Cell Reports**, v. 13, n. 2, p. 425–439, 2015.

OBENG-ADJEI, N. et al. Malaria-induced interferon- $\gamma$  drives the expansion of Tbethi atypical memory B cells. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006576, 27 set. 2017.

PAPE, K. A. et al. Different B Cell Populations Mediate Early and Late Memory During an Endogenous Immune Response. **Science**, v. 331, n. 6021, p. 1203–1207, 4 mar. 2011.

PARK, J. W. et al. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of Plasmodium vivax in Korea. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 1, p. 14–20, 2001.

PARMLEY, R. T.; HAJDU, I.; DENYS, F. R. Ultrastructural localization of the transferrin receptor and transferrin on marrow cell surfaces. **British Journal of Haematology**, v. 54, n. 4, p. 633–641, ago. 1983.

PAYNE, R. O. et al. Human vaccination against Plasmodium vivax Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. **JCI insight**, v. 2, n. 12, p. 1–17, 2017.

PÉREZ-MAZLIAH, D. et al. B-cell memory in malaria: Myths and realities. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 57–69, 16 jan. 2020.

PETTER, M.; DUFFY, M. F. Antigenic Variation in Plasmodium falciparum. In: [s.l.: s.n.]. p. 47–90.

PHIMPRAPHI, W. et al. Longitudinal study of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in a Karen population in Thailand. **Malaria Journal**, v. 7, 2008.

PIRES, C. V. et al. Blood-stage Plasmodium vivax antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0207244, 12 nov. 2018.

POPOVICI, J. et al. Genomic Analyses Reveal the Common Occurrence and Complexity of Plasmodium vivax Relapses in Cambodia. **mBio**, v. 9, n. 1, 7 mar. 2018.

- POPOVICI, J.; ROESCH, C.; ROUGERON, V. The enigmatic mechanisms by which *Plasmodium vivax* infects Duffy-negative individuals. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 2, p. 1–14, 2020.
- PORTUGAL, S. et al. B cell analysis of ethnic groups in Mali with differential susceptibility to malaria. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2012.
- PORTUGAL, S. et al. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. **eLife**, v. 4, n. MAY, p. 1–21, 2015.
- PORTUGAL, S. et al. Atypical memory B cells in human chronic infectious diseases: An interim report. **Cellular Immunology**, v. 321, n. June, p. 18–25, 2017.
- REYNAUD, C. A. et al. IgM memory B cells: A mouse/human paradox. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 10, p. 1625–1634, 2012.
- RIVERA-CORREA, J. et al. *Plasmodium* DNA-mediated TLR9 activation of T-bet<sup>+</sup> B cells contributes to autoimmune anaemia during malaria. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1282, 3 dez. 2017.
- RIVERA-CORREA, J. et al. Atypical memory b-cells are associated with *plasmodium falciparum* anemia through anti-phosphatidylserine antibodies. **eLife**, v. 8, p. 1–21, 2019.
- RUBTSOVA, K. et al. Age-Associated B Cells: A T-bet–Dependent Effector with Roles in Protective and Pathogenic Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 1933–1937, 1 set. 2015.
- RUBTSOVA, K. et al. B cells expressing the transcription factor T-bet drive lupus-like autoimmunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 4, p. 1392–1404, 27 fev. 2017.
- SABCHAREON, A. et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 3, p. 297–308, 1991.
- SAMPAIO, V. S. et al. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. suppl 1, p. 4–11, jun. 2015.
- SAN, N. N. et al. Cross-sectional study of asymptomatic malaria and seroepidemiological surveillance of seven districts in Gia Lai province, Vietnam. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, p. 40, 8 dez. 2022.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1 dez. 1977.
- SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; RIVIERE, L. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 445–470, 2008.
- SCHOLZEN, A. et al. BAFF and BAFF Receptor Levels Correlate with B Cell Subset Activation and Redistribution in Controlled Human Malaria Infection. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3719–3729, 2014.
- SES-MG. **Boletim Epidemiológico MGBelo Horizonte**Secretaria do Estado da Saúde MG, , 2018.
- SHANNON, P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 1 nov. 2003.
- SINDEN, R. E. Sexual development of malarial parasites. **Advances in parasitology**, v. 22, p. 153–216, 1983.

- SINGH, K. et al. Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. **NPJ vaccines**, v. 3, p. 48, 2018.
- SINGH, S. K. et al. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 741–744, 2006.
- SOARES, I. S. et al. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1606–1614, 1997.
- SOARES, I. S. et al. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 3, p. 357–363, 1999.
- SOARES, R. R. et al. What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis? **Pathogens and Global Health**, v. 111, n. 3, p. 107–115, 3 abr. 2017.
- SOUSA, T. N. et al. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian Plasmodium vivax populations. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2010.
- SOUZA-SILVA, F. A. et al. Naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein (DBP) in rural Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 185–193, 2010.
- SOUZA-SILVA, F. A. et al. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) immunity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.
- STRUIK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 268–290, 2004.
- STURM, A. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 1 set. 2006.
- SULLIVAN, R. T. et al. FCRL5 Delineates Functionally Impaired Memory B Cells Associated with Plasmodium falciparum Exposure. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 5, p. 1–19, 2015.
- SWAIN, S. L.; MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 136–148, 20 fev. 2012.
- TAKALA, S. L.; PLOWE, C. V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: Preventing and overcoming “vaccine resistant malaria”. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 9, p. 560–573, 2009.
- TARLINTON, D.; GOOD-JACOBSON, K. Diversity Among Memory B Cells: Origin, Consequences, and Utility. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1205–1211, 13 set. 2013.
- TAVARES, J. et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p. 905–915, 6 maio 2013.
- TEO, C. G.; WONG, H. B. The innate resistance of thalassaemia to malaria: a review of the evidence and possible mechanisms. **Singapore medical journal**, v. 26, n. 7, p. 504–9, dez. 1985.
- THAM, W. H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. Plasmodium vivax vaccine research – we’ve only just begun. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2–3, p. 111–118, 2017.
- TJITRA, E. et al. Multidrug-Resistant Plasmodium vivax Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. e128, 17 jun.

2008.

TOMARAS, G. D. et al. Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia. **Journal of Virology**, v. 82, n. 24, p. 12449–12463, 15 dez. 2008.

TORRES, L. DE M. **Antígenos envolvidos na invasão dos reticulócitos pelo Plasmodium vivax variabilidade genética do hospedeiro vertebrado e modulação : da resposta imune humoral**. [s.l.] Instituto René Rachou, 2017.

TSUBOI, T. et al. Natural variation within the principal adhesion domain of the Plasmodium vivax duffy binding protein. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5581–5586, 1994.

VALLEJO, A. F. et al. Plasmodium vivax gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 48, 28 dez. 2016.

VANBUSKIRK, K. M.; SEVOVA, E.; ADAMS, J. H. Conserved residues in the Plasmodium vivax Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15754–15759, 2004.

VERSIANI, F. G. et al. High levels of IgG3 anti ICB2-5 in Plasmodium vivax-infected individuals who did not develop symptoms. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2013.

WANG, H.; COLIGAN, J. E.; MORSE, H. C. Emerging Functions of Natural IgM and Its Fc Receptor FcMR in Immune Homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 15 mar. 2016.

WEISS, G. E. et al. Atypical Memory B Cells Are Greatly Expanded in Individuals Living in a Malaria-Endemic Area. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 2176–2182, 2009.

WEISS, G. E. et al. A positive correlation between atypical memory B cells and plasmodium falciparum transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2011.

WEISS, G. E.; CRABB, B. S.; GILSON, P. R. Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 284–295, abr. 2016.

WHITE, M. T. et al. Dynamics of the Antibody Response to Plasmodium falciparum Infection in African Children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 7, p. 1115–1122, 1 out. 2014.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. October, 2011.

WHO. **World Malaria Report 2021**. [s.l.: s.n.].

WILLIAMS, M. A.; BEVAN, M. J. Effector and Memory CTL Differentiation. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 171–192, abr. 2007.

WIPASA, J. et al. Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, 2010.

YAP, X. Z.; HUSTIN, L. S. P.; SAUERWEIN, R. W. TH1-Polarized TFH Cells Delay Naturally-Acquired Immunity to Malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. May, p. 1–6, 17 maio 2019.

ZINÖCKER, S. et al. The V Gene Repertoires of Classical and Atypical Memory B Cells in Malaria-Susceptible West African Children. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 3, p. 929–939, 2015.

ZUMPANO, J. Estudo Das Recaídas No Surto De Malária Por Plasmodium Vivax No Distrito De Sousa, Município de Rio Manso, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, 2004.



## RESEARCH ARTICLE

Antibody response to a new member of the DBL family (EBP2) after a brief *Plasmodium vivax* exposure

Bárbara A. S. Lima<sup>1</sup>, Gabriela M. Fernandes<sup>1</sup>, Leticia M. Torres<sup>1</sup>, Camilla V. Pires<sup>2</sup>, Jéssica R. S. Alves<sup>1</sup>, Sâmick L. Moreira-Nascimento<sup>1</sup>, Maria Fernanda A. Nascimento<sup>1</sup>, Sofia L. Afonso<sup>1</sup>, Helena L. Costa<sup>1</sup>, Isabela P. Cerávolo<sup>2</sup>, Tais N. Sousa<sup>1</sup>, Irene S. Soares<sup>1</sup>, Francis B. Ntumngia<sup>2</sup>, John H. Adams<sup>2</sup>, Luzia H. Carvalho<sup>1</sup>, Flora S. Kano<sup>1\*</sup>

**1** Biologia Molecular e Imunologia da Malária, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Center for Global Health and Infectious Diseases Research, College of Public Health, University of South Florida, Tampa, Florida, United States of America, **3** Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

\* [flora.kano@focruz.br](mailto:flora.kano@focruz.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Lima BAS, Fernandes GM, Torres LM, Pires CV, Alves JRS, Moreira-Nascimento SL, et al. (2022) Antibody response to a new member of the DBL family (EBP2) after a brief *Plasmodium vivax* exposure. *PLoS Negl Trop Dis* 16(6): e0210493. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0210493>

**Editor:** David Joseph Diemert, George Washington University School of Medicine and Health Sciences, UNITED STATES

**Received:** February 23, 2022

**Accepted:** May 12, 2022

**Published:** June 17, 2022

**Copyright:** © 2022 Lima 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 manuscript and its [Supporting Information files](#).

**Funding:** This work was supported by The Research Foundation of Minas Gerais (FAPEMIG) to FSK, INOVA/FIOC/UFZ (8571634294) to FSK, NIH grant 2R01AI064478-12A1 to JHA, The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) to LHC. This study was partially supported by the Coordenação de

## Abstract

*Plasmodium vivax* blood-stage invasion into reticulocyte is critical for parasite development. Thus, validation of novel parasite invasion ligands is essential for malaria vaccine development. Recently, we demonstrated that EBP2, a Duffy binding protein (DBP) paralog, is antigenically distinct from DBP and could not be functionally inhibited by anti-DBP antibodies. Here, we took advantage of a small outbreak of *P. vivax* malaria, located in a non-malarious area of Brazil, to investigate for the first time IgM/IgG antibodies against EBP2 and DEKnull-2 (an engineering DBP vaccine) among individuals who had their first and brief exposure to *P. vivax* (16 cases and 22 non-cases). Our experimental approach included 4 cross sectional surveys at 3-month interval (12-month follow-up). The results demonstrated that while a brief initial *P. vivax* infection was not efficient to induce IgM/IgG antibodies to either EBP2 or DEKnull-2, IgG antibodies against DEKnull-2 (but not EBP2) were boosted by recurrent blood-stage infections following treatment. Of interest, in most recurrent *P. vivax* infections (4 out of 6 patients) DEKnull-2 IgG antibodies were sustained for 6 to 12 months. Polymorphisms in the *ebp2* gene does not seem to explain EBP2 low immunogenicity as the *ebp2* allele associated with the *P. vivax* outbreak presented high identity to the original EBP2 isolate used as recombinant protein. Although EBP2 antibodies were barely detectable after a primary episode of *P. vivax* infection, EBP2 was highly recognized by serum IgG from long-term malaria-exposed Amazonians (range from 35 to 92% according to previous malaria episodes). Taken together, the results showed that individuals with a single and brief exposure to *P. vivax* infection develop very low anti-EBP2 antibodies, which tend to increase after long-term malaria exposure. Finally, the findings highlighted the potential of DEKnull-2 as a vaccine candidate, as in non-immune individuals anti-DEKnull-2 IgG antibodies were boosted even after a brief exposure to *P. vivax* blood stages.

**Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES—Finance Code 001.** LHC and TNS are a research fellow from CNPq. BASL and JRSA are supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and SLMN is supported by FAPEMIG. GMF and SLF are supported by CNPq. The funders had no role in study design, data analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

### Author summary

Vaccines might be a crucial component of the current efforts to malaria control and elimination, and much of the vaccine-related research on *P. vivax* has been focused on region II of the Duffy binding protein (DBP<sub>II</sub>), a ligand for human blood-stage infection. Recently, the newly described Erythrocyte binding protein 2 (EBP2), a *P. vivax* DBP paralog that it is antigenically distinct from DBP, was identified as potential vaccine targets. To date, scarce data are available about the naturally acquired immunity to EBP2. In a small outbreak of *P. vivax* malaria, located in a non-malarious area, we investigated whether a first *P. vivax* exposure induces antibodies against EBP2 that could be boosted by *P. vivax* recurrent infections. In parallel, we included an engineered DBP<sub>II</sub> vaccine (named DEKnull-2) whose antibody response were previously associated with broadly neutralizing *P. vivax* antibodies. This study shows EBP2, compared with DEKnull-2, was poorly immunogenic among individuals who experienced their first blood-stage *P. vivax* malaria infection. However, EBP2 was highly immunogenic in long-term malaria exposed individuals, reinforcing its potential as a *P. vivax* blood-stage vaccine candidate. Finally, our results reinforce that multiple blood-stage antigens should be targeted for the development of efficient vaccines against *P. vivax*.

### Introduction

Malaria remains a major public health concern despite all efforts for control. The World Health Organization registered 241 million malaria cases in 2020 with an estimated 12% increase in death rate compared to 2019 [1]. Among the *Plasmodium* parasite that infect humans, *Plasmodium vivax* is the most widespread outside the African continent [1]. Increasing reports of severe disease caused by *P. vivax*, drug resistance, and recurrent relapses by reactivation of liver stage hypnozoites are causes for concern [2–7]. Therefore, developing an effective vaccine is needed for current efforts to malaria control and elimination.

The invasion of the erythrocytes by *Plasmodium* spp merozoite is a multistep process mediated by molecular interaction between erythrocyte receptors and parasite ligands, and it is essential for parasite development [8–10]. Thus, a vaccine capable of inducing neutralizing antibodies against these invasion ligands is critical to prevent parasite invasion and, consequently, human disease [11–14]. For *P. vivax*, the leading blood-stage vaccine candidate, the Duffy binding protein (region II, DBP<sub>II</sub>), is involved in the interaction between the parasite and its receptor on reticulocytes, the Duffy antigen/ receptor for chemokines (DARC) [15–17]. Although antibodies that can inhibit the DBP<sub>II</sub>-DARC interaction (BIABs) are elicited only after a long-term exposure to malaria [18–22], high levels of BIABs are associated with clinical protection [19,23]. Recently, a *P. vivax* DBP paralog, and novel member of Erythrocyte binding-like family, termed Erythrocyte binding protein 2 (EBP2), was identified in field isolates [24]. EBP2 shares the key domain features of other invasion ligands, including the region II or Duffy binding-like (DBL) [24] but it is antigenically distinct from DBP and could not be functionally inhibited by anti-DBP antibodies [25]. Of interest, we demonstrated EBP2 host cell specificity is more restricted than DBP binding and that EBP2 binds preferentially to Duffy-positive young (CD71<sup>high</sup>) reticulocytes [25], which suggest that EBP2 may be involved in an alternative *P. vivax* invasion pathway.

A recent study investigated the potential existence of synergistic or additive effects of combinations of antibody responses to a panel of 38 *P. vivax* antigens on the reduced risk of *vivax*



malaria in children from Papua New Guinea (PNG) [26]. The results revealed that high level of antibodies against multiple antigens were associated with strong potential protective effect (PPE). In addition, the strongest PPE (> 90%) was observed using the combination among five antigens, including DBP11 and EBP2 [26]. More interestingly, the additive effect of the antibodies against DBP11 on the reduction clinical *P. vivax* malaria in children from PNG was associated with the antibodies against EBP2 [27], however, this association DBP11/ EBP2 was predominantly against a single DBP11 allele from PNG. In fact, the region II of DBP (DBP11), which contains residues for receptor-binding, is highly polymorphic [28–30], with induction of antibody response that are biased to specific allele [31,32]. To overcome the inherent bias towards induction of strain-specific immune responses, an engineered DBP11 vaccine, termed DEKnull-2, elicited a strong broadly neutralizing antibody response, including induction of long-term persistent antibody responses of naturally acquired immunity [33].

Scarce data are available on naturally acquired immunity to the newly described EBP2, most of which are restricted to Southeast Asian [26,27,34]. Considering the potential of the association between EBP2 and to the next generation of engineered DBP11 immunogen (DEKnull-2) as vaccine against *P. vivax* blood-stage, we investigated here whether a first *P. vivax* exposure is able to induces antibodies against EBP2 and DEKnull-2, and if these responses could be boosted by *P. vivax* relapses/recurrence. This study took advantage of an outbreak of *P. vivax* malaria, in a non-endemic area in Brazil. We demonstrated that EBP2 was poorly immunogenic among individuals who experienced their first blood-stage *P. vivax* malaria infection compared with DEKnull-2. However, EBP2 was shown to be highly immunogenic in long-term malaria exposed individuals.

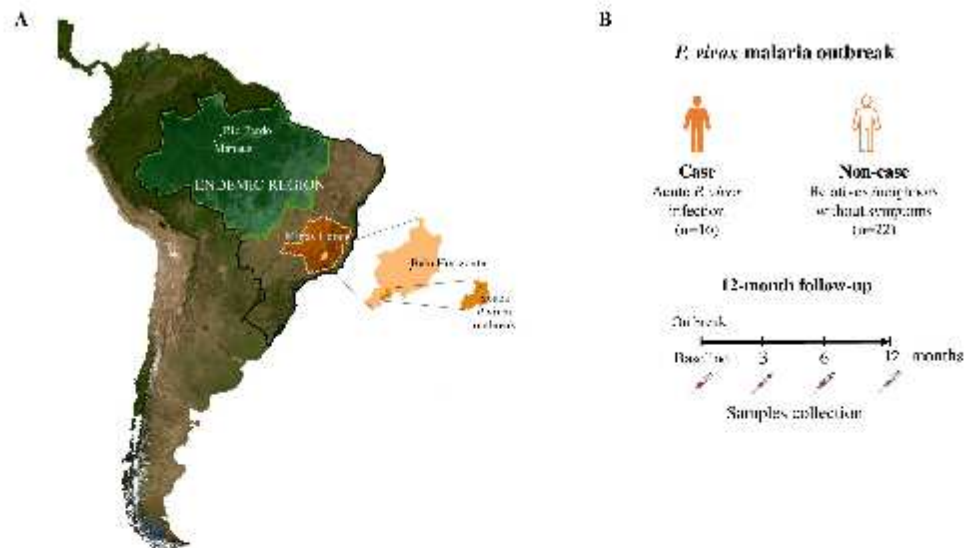
## Material and methods

### Ethics statement

The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings of the Institute René Rachou / FIOCRUZ Minas (No. 007/2006, No. 07/2009, No.12/2010, No. 26/2013, and CAAE 50522115.7.0000.5091). The study participants were informed about the aims and procedures of the study and voluntary participation solicited and agreed with voluntary participation through written formal consent. For the child participants, the written formal consent was obtained from the parent/guardian. The current study was conducted according to Laboratory biosafety and biosecurity policy guidelines of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ, Ministry of Health, Brazil ([http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/manuals/biosseg\\_manuals.html](http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/manuals/biosseg_manuals.html))).

### Study site and population

***P. vivax* malaria outbreak, participants, and sample collection.** This study was carried out in a small community, named Souza, that has about 1,100 inhabitants located on the banks of one of the arms of the Brumadinho dam, about 70 km far from Belo Horizonte, Minas Gerais State, a non-malarious endemic region of Brazil [31]. Malaria has never been reported in this area before which is about 2,000 km away from the Brazilian malaria endemic region—Amazon region (Fig 1A). The source of the infection was a man from the community who returned infected by *P. vivax* from the Amazon region in January 2003, and experienced recurrence in the following months. The first human malaria case detected in the outbreak area, named S14, remained at the hospital for about 10 days, until a malaria diagnosis could be established. Because malaria infection had never been reported in the outbreak area previously, the physicians failed to consider malaria on presentation of this patient. The *P. vivax* malaria outbreak lasted for approximately 60 days (between April and May) in 2003, with the last



**Fig 1. Localization of study site and design.** (A) The Brazil map in South America showing the localization of the *P. vivax* malaria outbreak that occurred in small village named Souza, Minas Gerais state (orange), outside of the Amazonian endemic region for malaria in Brazil (grey), and 2000 km away from endemic region (green). (B) Study design of first and brief *P. vivax* exposure that included individuals with acute malaria infection confirmed by microscopy (Cases,  $n = 16$ ), and relatives and/or neighbors without malaria symptoms and negative microscopy diagnosis (non-Case,  $n = 22$ ). The 12-month follow-up were initiated briefly after the beginning of outbreak (BL, baseline) with three additional and identical cross-sectional surveys carried-out at 3, 6 and 12 months after the first survey. Adapted from U.S. Geological Survey (USGS) (<https://www.usgs.gov/>).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010493.g001>

malaria case diagnosed on 21 May 2003; since then, local/regional of Minas Gerais Departments of Health had maintained entomological and epidemiological surveillance of the area until the end of 2003. The entomological surveys incriminated the vector *Anopheles darlingi* as responsible for local malaria transmission [35]. Control activities also included an active search for acute malaria by thick blood smears and outdoor/ indoor spraying of residual insecticide (cypermethrine) [36]. During the outbreak, 25 individuals presented febrile symptoms such as fever, headache, myalgia and confirmed *P. vivax* infection by microscopy (Case). In that time, all patients were promptly treated with chloroquine (1.5 g for 3 days) plus primaquine (30 mg daily for 7 days) and followed-up. In the case of relapses and/or recrudescence, a second round of treatment was administered (3-day course of chloroquine and a 15-day course of primaquine). Sixteen out of 25 cases (median 27 years, interquartile range, IRQ: 20–42) were enrolled in the current study, and 6 out of the 16 (38%) cases experienced one or two recurrent *P. vivax* infections. All *P. vivax* recurrent infection were confirmed by thick blood smears and DNA sequencing of a single *dbpII* allele [31]. In addition, 22 relatives and/or neighbors (median 24 years, IRQ: 20–45) who were exposed at the risk of *P. vivax* transmission but did not develop blood-stage infection were included as non-Cases (Fig 1B). The aims of the project were discussed with the community and after the written agreement consent 5 ml of whole blood were collected in EDTA vacutainer tube to obtain plasma and DNA from all participants. The followed-up were initiated briefly after the beginning of outbreak (Baseline), with three others cross-sectional surveys were carried-out 3, 6 and 12 months after the first survey.



**Long-term malaria-exposed individuals.** To evaluate the influence of time on malaria exposure and acquisition of naturally antibody response to recombinant *P. vivax* proteins, additional sera samples of individuals with long-term malaria exposure (median 17 years, IQR: 11–33) from a rural community of the Amazon rain forest (Rio Pardo, Amazonas) were included in the current study (Fig 1A). The details of the study site and malaria transmission patterns were described previously [22,37]. For the current study, we selected sera samples from individuals who had single or multiple clinical *P. vivax* malaria episodes, whose *P. vivax* infections were confirmed by microscopy (official malaria data available at the Brazilian Malaria Epidemiological Surveillance Information System—SIVEP—Malaria).

**Recombinant blood-stage *P. vivax* antigens.** *EBP2.* Recombinant EBP2, which includes amino acids 159–485 from C127 Cambodian isolate [24], was codon-optimized for expression in *Escherichia coli*, cloned into pET21a vector, with a C-terminal 6xHis tag. After expression, recombinant EBP2 was purified from inclusion bodies by affinity chromatography using Ni + Sepharose 6 fast flow (GE Lifesciences), and refolded by a rapid dilution, resulting in a 37 kDa protein as previously described [25].

**DBP-II-based antigens.** Recombinant engineered vaccine DEKnull-2 [33], based on domain II of *P. vivax* Duffy binding protein (DBP-II) (243aa–573aa), and DBP-II Souza isolate from the outbreak (DBP-II-outbreak) [31] were expressed in *E. coli* as 39 kDa protein fusion with 6xHis tag and purified as previously described [33,38].

**MSP1-19.** The 19-kDa C-terminal fragment of the Merozoite Surface Protein-1 of *P. vivax* (MSP1-19), which represents amino acids 1616–1704 of the full-length MSP-1 polypeptide, was expressed as a 6xHis tag fusion protein and purified as described previously [39].

**Serological assay.** Plasma IgM and IgG antibodies level were measured by conventional ELISA [40,41]. Briefly, the concentration of all recombinant *P. vivax* proteins was previously titrated, and defined as 1.5 µg/ml for EBP2, 3 µg/ml for DBP-II-outbreak and DEKnull-2, and 1 µg/ml for MSP1-19. Plasma samples were diluted at 1:400 and 1:100 for IgM and IgG, respectively. Peroxidase-conjugated IgM and anti-IgG were used as secondary antibody at 1:5000 dilution. Results were expressed as ELISA reactivity index (RI) for each protein, calculated as the ratio of the mean optical density (OD at 492nm) of sample to the mean OD plus three standard deviations of 20–30 unexposed volunteers. Values of RI > 1.0 were considered positive.

**Amplification and sequencing of *ebp2* alleles from the outbreak.** The primer sets used for the amplification and sequencing of *ebp2* gene of *P. vivax* from the outbreak isolate were designed using Cambodian field isolate (C127) as a reference (accession number: KC987954) [24]. To cover a larger DBL region of *ebp2* (979 bp) and to obtain high quality of the full *ebp2* sequence, we designed three sets of overlapping primers that covers a region beyond the DBL of EBP2, corresponding to nucleotides 201 to 1618 (aa 68–535) (S1 Fig). The PCR was performed using high fidelity platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) with the following primer sets: fragment 1 (F1: 5'-AGAAATAAGAAAAGAGCAGTAG-3') and (R1: 5'-ATTTCCATGOGCCACGATG-3'); fragment 2 (F2: 5'-CAAGTCCTTCTTTCACTAAC-3'), and (R2: 5'-GTATCCATTGCTCCTTCTTTA-3') and fragment 3 (F3: 5'-AGGTAAAGGCAAAGAAGGCA-3') and (R3: 5'-CTCTTCCCTTTACTCTTCCCA-3'). The PCR products were purified using the ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix, USB) and sequenced by Sanger method directly using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems—Life Technologies) and ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems). The sequences were analyzed using Bioedit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) and Chromas version 2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). A total of six reads of each fragment was used for alignment and construction of the sequence contig of *ebp2* (EBP2 outbreak) which was compared to the reference sequence of C127 isolate.

## Statistical analysis

The graphics and analysis were performed using GraphPad Prism version 9 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) and the R statistical software (version 3.3.2). Differences in proportions were evaluated by chi-square ( $\chi^2$ ) or Fisher's exact tests, as appropriate. Shapiro-Wilk test was performed to evaluate the normality distribution of variables. Differences in means or medians of antibody levels among the groups were performed using one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test followed by Tukey's or Dunn's post hoc test, as appropriate. Multivariate logistic regression models were built to describe independent associations between covariates (age, gender, number of previous malaria episodes, and recent malaria) and antibodies against EBP2 and DEKnull-2. All analyses were considered statistically significant at the 5% level ( $P < 0.05$ ).

## Results

### IgM and IgG antibody responses to DBL- antigens after the first *P. vivax* exposure

In the *P. vivax* outbreak study area, we evaluated the IgM and IgG antibodies against two members of the *P. vivax* DBL family, the novel EBP2 and the engineered DBPII based vaccine (DEKnull-2). In addition, the well-characterized *P. vivax* MSP1-19 was included as a highly immunogenic *P. vivax* blood-stage antigen. The demographic, epidemiological and immunological data at enrollment of case (*P. vivax* infection,  $n = 16$ ) and non-case (negative relative and/or neighbors,  $n = 22$ ) are summarized in Table 1. At the baseline, one out of 16 (6%) cases showed detectable IgM antibodies response to EBP2 and DEKnull-2 while nine out of 16 cases (56%) were positive for IgM antibody response to MSP1-19. Non-cases had barely IgM response to DEKnull-2 and MSP1-19. For IgG antibody response, 69% (11 out of 16) of the cases showed IgG response to MSP1-19, followed by 6% to DEKnull-2. There were no detectable IgG antibodies against EBP2. As expected, no one of non-cases showed detectable IgG response.

Further, the IgM and IgG antibodies against all antigens studied were evaluated over time, including 3, 6, and 12-month after the enrollment (Fig 2). Barely detectable IgM antibody

**Table 1. Demographic, epidemiological, and immunological data of individuals in the *P. vivax* malaria outbreak area at enrollment.**

Characteristics		Case <sup>1</sup> (n = 16)	Non-Case <sup>2</sup> (n = 22)
Age, years (median, IQR <sup>3</sup> )		27 (20–42)	24 (20–45)
Gender, male:female ratio		2:1	0.4:1
Antibody response <sup>4</sup> , n (%)			
IgM	EBP2	1 (6%)	0 (0%)
	DEKnull-2	1 (6%)	1 (5%)
	MSP1-19	9 (56%)	1 (5%)
IgG	EBP2	0 (0%)	0 (0%)
	DEKnull-2	1 (6%)	0 (0%)
	MSP1-19 <sup>5</sup>	11 (69%)	0 (0%)

<sup>1</sup> confirmed symptomatic *P. vivax* infection (positive blood-smears by microscopy diagnosis)

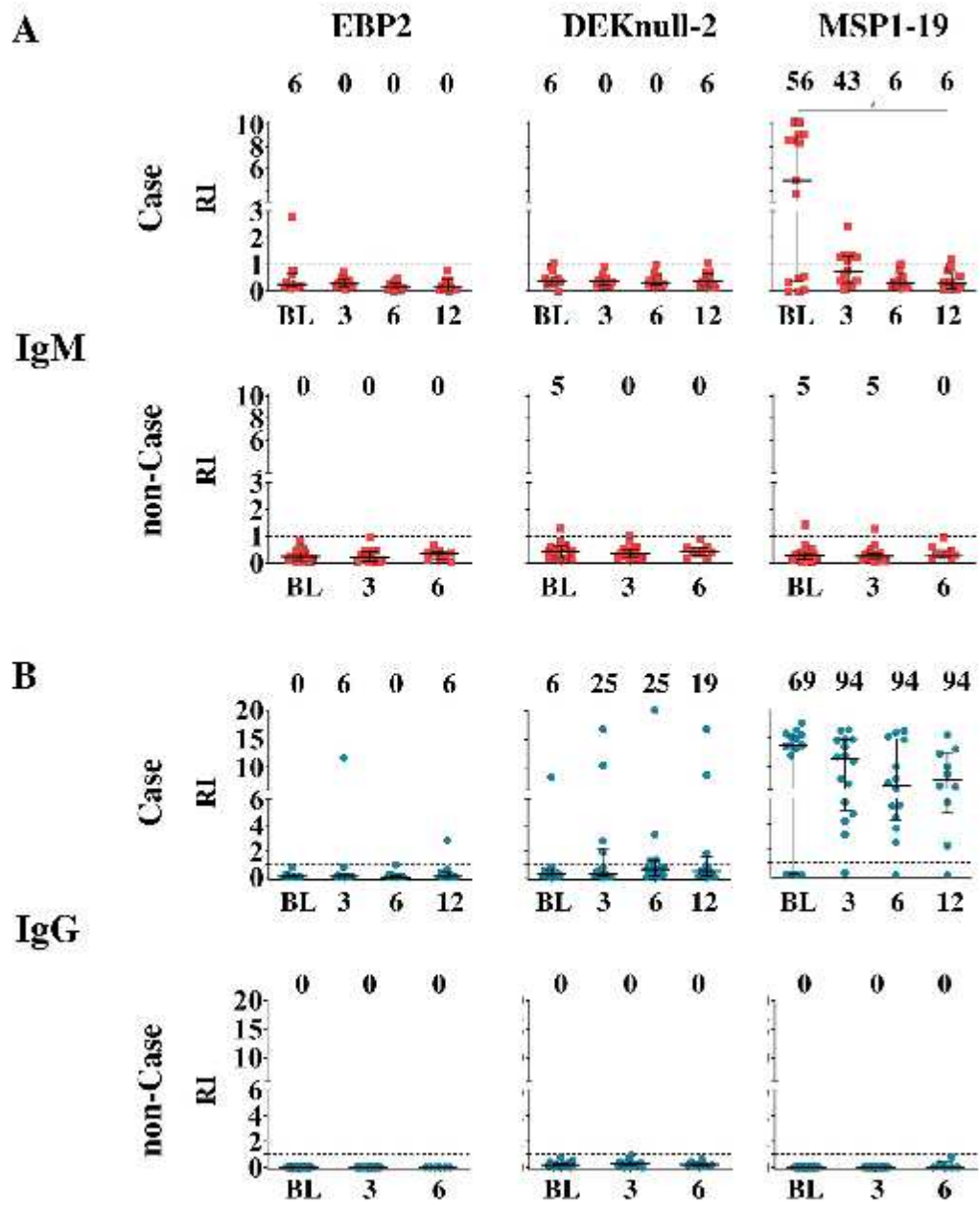
<sup>2</sup> relatives and/or neighbors exposed at the risk of *P. vivax* transmission during the outbreak without symptoms or blood parasites

<sup>3</sup> IQR = Interquartile Range

<sup>4</sup> evaluated by conventional ELISA using recombinant *P. vivax* proteins

<sup>5</sup> according to [31]

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010493.t001>





**Fig 2. IgM and IgG antibodies responses to *P. vivax* antigens after the first *P. vivax* exposure.** (A) Frequency and level of IgM antibodies against *P. vivax* EBP2, DEKnull-2 and MSP1-19 in individuals with acute *P. vivax* infection (Case,  $n = 16$ ), and relatives and/or neighbors without malaria symptoms (non-Case,  $n = 22$ ). (B) Frequency and level of IgG antibody against *P. vivax* EBP2, DEKnull-2 and MSP1-19 in Case and non-Case. The IgM and IgG antibody responses were evaluated at the outbreak (BL, baseline), 3, 6 and 12 months after the *P. vivax* outbreak for Case group, and at BL, 3, 6-month for non-Case group. Sera reactivity was expressed as ELISA Reactivity Index (RI). Percentage (%) of antigen-specific IgM and IgG positive was expressed at the top of the graph. The dashed line represents  $RI = 1$ . Samples with  $RI > 1.0$  are considered positive. Differences statistically significant were indicate by asterisk (\* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010493.g002>

responses to either EBP2 or DEKnull-2 were observed over the 12-month follow-up period (Fig 2A). A similar result was observed with the DBPII allele associated with the *P. vivax* outbreak (S2A Fig). In *P. vivax* cases, while IgM antibody response to MSP1-19 was 56% at the baseline, frequencies and levels of responders sharply decreased after the 3<sup>rd</sup> month of the follow-up (43% to 6% from 3 to 12 months, respectively; Chi-square,  $p < 0.001$ ) (Fig 2A, right top panel). In non-case, IgM antibody response to all antigens were not detected, except a barely response to MSP1-19 (Fig 2A, bottom panel).

For IgG antibodies against EBP2, a single *P. vivax* case (one out of 16, 6%) showed detectable antibodies at 3 and 12-month of follow-up (Fig 2B, first left panel). The proportion of DEKnull-2 IgG responders was much higher at 3-month of follow-up (4 out 16, 25%), and remained stable over the follow-up period. Considering the DBPII-outbreak allele, the proportion of DBPII responders was similar to that of DEKnull-2 at 3-month, however, the level of DBPII IgG antibodies was lower and the proportion of DBPII IgG responders fluctuated over 12 months (S2A Fig). As expected, the proportion of MSP1-19 IgG responders was more than 90% with high IgG levels (Fig 2B, right panel). In non-cases, no detectable *P. vivax*-specific IgG antibodies was observed at any time of the observational period (Fig 2B, bottom panel).

### The *ebp2* allele amplification and sequencing

Previously, DNA sequences from primary/recurrent *P. vivax* outbreak samples identified a single *dbpII* allele among samples from the outbreak area [31]. Here, we sequenced the full DBL domain of EBP2 (region II) that shares common features characteristics with members of DBL family (Fig 3A). A sequence alignment of the full amino acid sequences of the EBP2 DBL domain (aa 159 to 485) with the reference sequence of the Cambodian *P. vivax* C127 isolate [24], showed a very high sequence similarity between isolates with a single amino acid substitution of Glu-Lys at position 353 (E353K), resulting from a non-synonymous nucleotide polymorphism at position 1057 (G1057A), (Fig 3B).

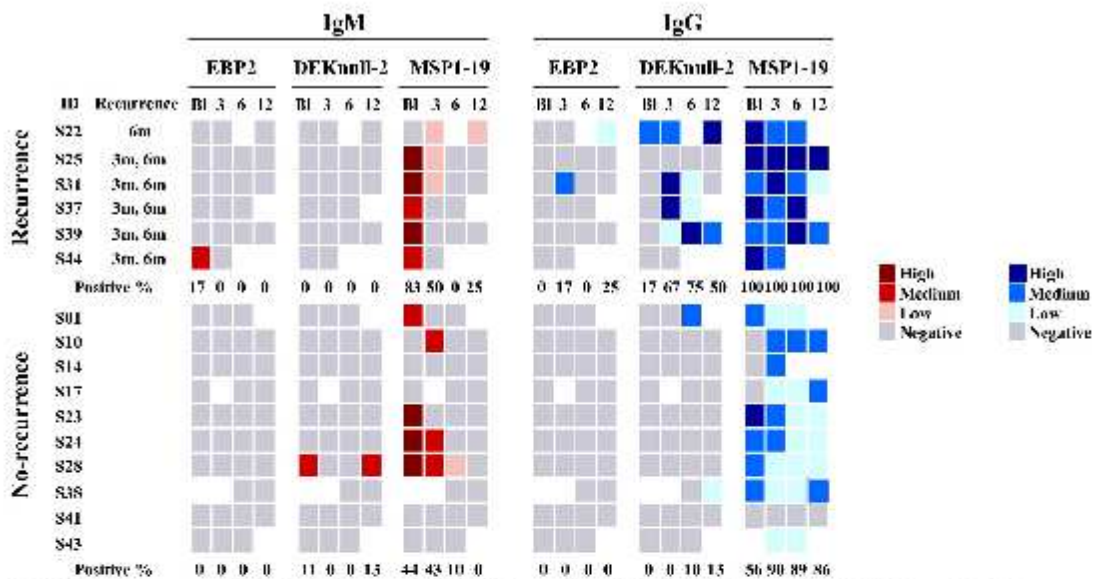
### Influence of *P. vivax* infection recurrence on IgM and IgG antibody responses to DBL-antigens

Next, we sought to investigate the influence of *P. vivax* recurrent infections on naturally acquired antibody response to EBP2, DEKnull-2 and MSP1-19 (Fig 4). Individuals who experienced their primary blood-stage *P. vivax* infection were divided into two subgroups: (i) *Recurrence*—individuals who experienced at least one additional episode of blood-stage *P. vivax* infection after their primary clinical attack ( $n = 6$ ); (ii) *No-recurrence*—cases who did not have additional *P. vivax* blood-stage infections ( $n = 10$ ).

In *P. vivax* recurrent infections, it was not possible to detect booster effect on EBP2 or DEKnull-2 IgM antibodies, as all individuals remained with undetectable antibody response (Fig 4). A different profile was obtained for MSP1-19, in which most individuals responded with increased titers of IgM antibodies. Considering IgG response, DEKnull-2 (but not EBP2) showed a significant booster response during the recurrence (Fig 4, right panel); more specifically, most recurrent *P. vivax* cases were associate with increased levels of anti-DEKnull-2 IgG







**Fig 4. Influence of recurrence on the IgM and IgG responses to distinct *P. vivax* vaccine candidates.** Individuals who experienced first *P. vivax* malaria infection (Cases) were grouped into: (i) Recurrence ( $n = 6$ )—individuals who experienced one or two additional recurrent *P. vivax* infection; and (ii) No-recurrence ( $n = 10$ )—individuals who did not have additional blood-stage *P. vivax* infection. IgM (red) and IgG (blue) antibodies responses to EBP2, DEKnull-2 and MSP1-19 were measured by ELISA at baseline (Bl), 3, 6, and 12-month after the outbreak. The color gradient indicates the intensity of IgM (red) and IgG (blue) antibody levels categorized by tercile in High (Upper tercile), Medium (Second tercile) and Low (First tercile) for each protein and parasitemia (orange) according to parasitemia range. The time points of follow-up study and recurrent *P. vivax* infection moment were indicated at the heatmap.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010483.g004>

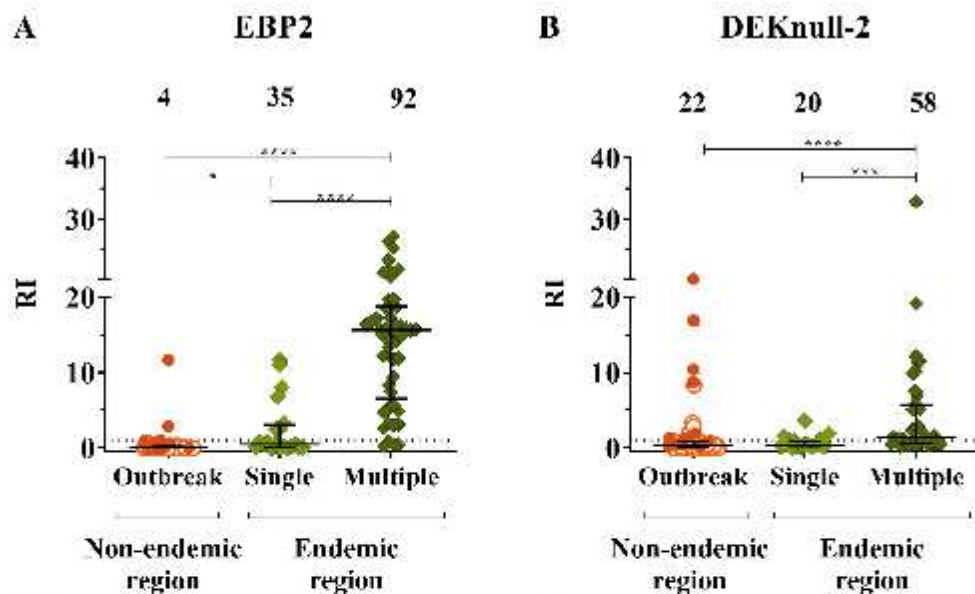
antibodies, resulting in the proportion of positive ranging from 50 to 75%. However, no-Recurrence subgroup had low frequency of DEKnull-2 IgG responders (0 to 13%). The profile of IgG antibodies to the DBPII-outbreak allele was similar to DEKnull-2, although the frequency and intensity of IgG response to DBPII seems to decrease more rapidly (S2B Fig). In recurrence subgroup, parasitemia did not associated with booster response to both DEKnull-2 or DBPII (S3 Fig).

Overall, it was not possible to detect booster effect on EBP2 or DEKnull-2 IgM antibodies, but recurrent *P. vivax* infections influenced IgG antibody response to DEKnull-2.

#### Risk factors associated with IgG antibody response to EBP2 and DEKnull-2

The evaluation of naturally acquired antibody response to EBP2 among individuals who experienced their first and brief *P. vivax* exposure suggested that EBP2 is a poorly immunogenic antigen. Thus, we hypothesized that *P. vivax* EBP2 specific IgG antibody response could be dependent on the long-term exposure to malaria. For that, we included additional sera from individuals with long-term exposure to unstable malaria transmission in the Amazon region, which were grouped as having a single or multiple clinical *P. vivax* episodes (microscopically confirmed).

As compared with *P. vivax* malaria outbreak group, the proportion of EBP2 responders was quite different in individuals living in the malaria endemic region (Fig 5). The frequency of EBP2 IgG responders ranged from 35% (7/20) to 92% (45/49) between individuals who had



**Fig 5. IgG response to distinct *P. vivax* DBL vaccine candidates among individuals with different previous malaria episodes.** Frequency and levels of IgG antibody against *P. vivax* (A) EBP2 and (B) DEKnull-2 among (1) Outbreak ( $n = 55$ )—individuals from non-endemic region, including recurrent *P. vivax* infection (dosed circle) and without recurrence (open circle) and, individuals long-term malaria exposure from endemic region with (2) Single previous malaria episode ( $n = 20$ ) and multiple episodes ( $n = 49$ ). Sera reactivity was expressed as ELISA Reactivity Index (RI). Samples with RI  $> 1.0$  were considered positive. The percentage (%) of positive IgG antibody response to each protein was expressed at the top of the graph. Differences statistically significant were indicate by asterisk (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010493.g005>

had a single or multiple *P. vivax* malaria episodes (Chi-square,  $p < 0.0001$ ). Moreover, multiple malaria episodes were associated with much higher levels of IgG antibodies ( $p < 0.0001$ ). A similar profile of antibody response was observed with DEKnull-2 (Fig 5B).

Finally, we performed a multiple linear regression analysis adjusted by age, gender, number of previous malaria episode and time since the last malaria episodes, to evaluate which variables were associated with the risk to develop antibody response to each proteins studied (S1 Table). The number of previous malaria episodes increased by two-fold the chance of having a positive antibody response to EBP2 (aOR = 1.95, 95% CI = 1.51–2.51,  $P < 0.0001$ ) and in 1.2 times for antibodies against DEKnull-2 (DEKnull-2, aOR = 1.24, 95% CI = 1.01–1.40,  $P = 0.001$ ), confirming the influence of exposure to malaria on the IgG antibody response to these *P. vivax* ligands.

## Discussion

Efforts to prioritize *P. vivax* antigen-combination for vaccine development suggest an additive effect of antibodies against DBPII and the recently described EBP2 [26,27]. While these findings are promising, a major drawback was the observation that the protective effect of the EBP2-DBPII combination was DBPII allele-specific [27]. Considering that available data on naturally acquired immunity to the EBP2 is still scarce [26,27,34], we investigated here whether



a primary *P. vivax* exposure induces antibodies against EBP2 that could be boosted by *P. vivax* relapses or recurrent infections. Our experimental approach also involved an engineering DBPPI immunogen (DEKnull-2) whose immune response has been associated with strain-transcending antibodies [33]. The results showed that a primary *P. vivax* infection was not sufficient to induce significant IgM/ IgG antibodies to either EBP2 or DEKnull-2. Unexpectedly, EBP2 antibodies were not boosted by *P. vivax* recurrent infections following antimalarial treatment; at the time of the outbreak, it was not possible to differentiate recrudescence due to therapeutic failures or relapses arising from persistent liver stages of the parasite (hypnozoites) [31]. On the other hand, IgG antibodies against DEKnull-2 were boosted by recurrent blood-stage *P. vivax* infections, as well as antibodies against the homologous DBPPI variant linked to the outbreak. These results with DEKnull-2 are of interest because we and others have demonstrated before that naturally acquired DBPPI antibodies tend to be short-lived and biased towards strain-specific responses [31,32]. Of interest, sustained DEKnull-2 IgG responses had also been described in long-term malaria exposed individuals [41], reinforcing the potential of DEKnull-2 as vaccine target.

Although the reasons for the absence of anti-EBP2 booster in *P. vivax* primo infections are not known, it is possible to speculate that polymorphisms in *ebp2* gene could be a factor, as data from Southeast Asian suggested that region II of EBP2 is highly polymorphic [34]. However, polymorphism in the *ebp2* gene does not seem to explain EBP2 low immunogenicity because the *ebp2* allele from the *P. vivax* outbreak showed high sequence identity to the reference Cambodian isolate d C127 (used here as recombinant protein). Specifically, these alleles differed by a single nucleotide polymorphism (G1057A). A more plausible explanation to the low immunogenicity of EBP2 in *P. vivax* primo infected may be related to the host cell specificity as we have previously demonstrated that EBP2 binding properties is much more restricted than observed for DBPPI, linking preferentially to Duffy-positive immature bone marrow reticulocytes (CD71<sup>high</sup>) [25]. In addition, *Plasmodium* reticulocyte invasion takes less than one minute [8,42,43], therefore, like DBP and other members of the DBL family, EBP2 may be released "just in time" for reticulocyte attachment and/or junction formation and invasion [16,44,45]. Consequently, multiple *P. vivax* infections are required to induce a significant and specific antibody response. This evidence supports our finding that a low EBP2 immunogenicity after a first *P. vivax* infection is followed by high recognition (>90%) after long-term malaria exposure in the Amazonian area. These results, although there are limitations of small number of sample size from the *P. vivax* outbreak, were reinforced by related studies that showed EBP2 was poorly immunogenic in PNG children but anti-EBP2 antibodies levels were positively correlated with age and cumulative exposure [27]. Considering that EBP2/DBPPI antibody-combinations are associated with reduced risk of clinical disease [26,27], and anti-EBP2 antibodies can block EBP2-erythrocyte binding [25], further characterization of EBP2 including large number of sample size, other populations and functional studies to evaluate the potential for EBP2 IgG antibodies to block *P. vivax* reticulocyte invasion are necessary to further validate EBP2 as a potential candidate to partner with DBPPI and related antigen, DEKnull-2, in a multivalent blood-stage vaccine against *P. vivax*.

## Conclusion

Taken together, our results showed that EBP2 was poorly immunogenic after a single and brief *P. vivax* exposure, but it is highly immunogenic after long-term malaria exposure. Finally, the findings further supported the potential of DEKnull-2 as a vaccine candidate, as in non-immune individuals anti-DEKnull-2 IgG antibodies were boosted after brief exposure to *P. vivax* blood stages.

### Supporting information

**S1 Fig. Depiction of primers for sequencing of the DBL domain of EBP2 of *P. vivax* Outbreak isolate.** To sequence the full Duffy Binding-like (DBL) domain of EBP2, three sets of primers were designed to amplify three overlapping fragments. Positions of primers are indicated (Forward and Reverse): Fragment 1 in pink (position 201bp to 870bp), Fragment 2 in blue (position 712bp to 1262bp) and Fragment 3 in green (position 996bp to 1618bp). (TIFF)

**S2 Fig. IgM and IgG antibody profile of *P. vivax* DBP11 after first *P. vivax* exposure.** (A) Frequency and level of IgM and IgG antibody against *P. vivax* DBP11-outbreak in individuals with acute *P. vivax* infection (Case,  $n = 16$ ), and relatives and/ or neighbors without malaria symptoms (Non-Case,  $n = 22$ ). The IgM and IgG antibody responses were evaluated at the *P. vivax* outbreak (BL, baseline), 3, 6 and 12 months after the outbreak for both the Case and Non-Case groups. Serum reactivity was expressed as ELISA Reactivity Index (RI). Percentage (%) of antigen-specific IgM and IgG positive was expressed at the top of the graph. The dashed line represents  $RI = 1$ . Samples with  $RI > 1.0$  are considered positive. (B) Heatmap of influence of *P. vivax* recurrence on the IgM and IgG antibody responses to *P. vivax* DBP11. Individuals who experienced first *P. vivax* malaria infection (Cases) were grouped into: (i) Recurrence ( $n = 6$ )—individuals who experienced one or two additional recurrent *P. vivax* infection; and (ii) No-recurrence ( $n = 10$ )—individuals who did not have additional blood-stage *P. vivax* infection. The color gradient indicates the intensity of IgM (red) and IgG (blue) antibody levels categorized by tercile in High (Upper tercile), Medium (Second tercile) and Low (First tercile) for each protein. The time points of follow-up study and recurrent *P. vivax* infection moment were indicated at the heatmap. (JPG)

**S3 Fig. Influence of *P. vivax* parasitemia on booster IgG antibody response to both DEKnull-2 and DBP11 among individuals experienced *P. vivax* recurrence.** (A) Parasitemia (parasites/ $\mu$ L) (dashed line) and IgG antibody level against DEKnull-2 (continuous line), expressed by Reactivity index (RI) for each subjects experienced *P. vivax* recurrence; (B) Parasitemia (parasites/ $\mu$ L) (dashed line) and IgG antibody level against DBP11 (continuous line), expressed by Reactivity index (RI) for each individual experienced *P. vivax* recurrence (3 and 6 months after the first *P. vivax* infection). The x-axis represents the time of *P. vivax* recurrence (3 and 6 months after the first *P. vivax* infection). (TIFF)

**S1 Table. Risk factors associated with immunological response against *P. vivax* blood stage vaccine antigens.** (DOCX)

**S1 Data. Demographic, epidemiological data and immunological response against *P. vivax* blood stage vaccine antigens of the study population.** (XLS)

### Acknowledgments

We thank the inhabitants of Souza and Rio Pardo populations for participation in the current study, their consent and cooperation. We would like to thank the Foundation Oswaldo Cruz in Manaus-AM (FIOCRUZ Amazônia), in Belo Horizonte-MG (FIOCRUZ Minas), Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of the Next Generation Sequencing (RP/T01F) facility for all support.



### Author Contributions

**Conceptualization:** Bárbara A. S. Lima, Flora S. Kano.

**Data curation:** Luzia H. Carvalho, Flora S. Kano.

**Formal analysis:** Bárbara A. S. Lima, Gabriela M. Fernandes, Camilla V. Pires, Tais N. Sousa, Flora S. Kano.

**Funding acquisition:** John H. Adams, Luzia H. Carvalho, Flora S. Kano.

**Investigation:** Bárbara A. S. Lima, Gabriela M. Fernandes, Leticia M. Torres, Jéssica R. S. Alves, Sâmick L. Moreira-Nascimento, Maria Fernanda A. Nascimento, Sofia L. Afonso, Helena L. Costa.

**Methodology:** Bárbara A. S. Lima, Leticia M. Torres, Camilla V. Pires, Isabela P. Cerávolo, Tais N. Sousa, Francis B. Ntumngia, John H. Adams, Flora S. Kano.

**Project administration:** Flora S. Kano.

**Resources:** Irene S. Soares, Francis B. Ntumngia.

**Supervision:** Luzia H. Carvalho, Flora S. Kano.

**Validation:** Bárbara A. S. Lima, Gabriela M. Fernandes, Leticia M. Torres, Maria Fernanda A. Nascimento.

**Visualization:** Bárbara A. S. Lima, Leticia M. Torres, Maria Fernanda A. Nascimento.

**Writing – original draft:** Bárbara A. S. Lima, Flora S. Kano.

**Writing – review & editing:** Bárbara A. S. Lima, Gabriela M. Fernandes, Leticia M. Torres, Camilla V. Pires, Jéssica R. S. Alves, Sâmick L. Moreira-Nascimento, Maria Fernanda A. Nascimento, Sofia L. Afonso, Helena L. Costa, Isabela P. Cerávolo, Tais N. Sousa, Irene S. Soares, Francis B. Ntumngia, John H. Adams, Luzia H. Carvalho, Flora S. Kano.

### References

1. WHO. World Malaria Report 2021. 2021.
2. Tjitra E, Anstey NM, Sugianto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. Rogerson S, editor. *PLoS Med.* 2008; 5: e128. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050128> PMID: 18563862
3. Genton B, D'Aceomont V, Rane L, Baea K, Feeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea. Rogerson S, editor. *PLoS Med.* 2008; 5: e127. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050127> PMID: 18563961
4. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 2009; 25: 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.003> PMID: 19349210
5. Ferreira MU, Nobrega de Sousa T, Rangel GW, Johansen IC, Corder RM, Ladeia-Andrade S, et al. Monitoring *Plasmodium vivax* resistance to antimalarials: Persisting challenges and future directions. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2021; 15: 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijpdr.2020.12.001> PMID: 33360105
6. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* Infection Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites. *J Infect Dis.* 2007; 195: 927–933. <https://doi.org/10.1086/512241> PMID: 17330781
7. Popovici J, Friedrich LR, Kim S, Bin S, Run V, Lek D, et al. Genomic Analyses Reveal the Common Occurrence and Complexity of *Plasmodium vivax* Relapses in Cambodia. Miller LH, editor. *MBio.* 2018;9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01888-17> PMID: 29362233

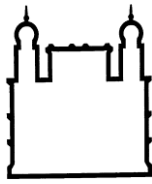
8. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham WH, Duraisingh MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host Microbe*. 2017; 22: 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003> PMID: 28799908
9. Kanjee U, Rangef GW, Clark MA, Duraisingh MT. Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes. *Curr Opin Microbiol*. 2018; 46: 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.10.002> PMID: 30366310
10. Kepple D, Pestana K, Tomita J, Abebe A, Gotassa L, Lo E. Alternative invasion mechanisms and host immune response to *Plasmodium vivax* malaria: Trends and future directions. *Microorganisms*. 2021; 9: 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010015> PMID: 33374598
11. Beeson JG, Crabb BS. Towards a Vaccine against *Plasmodium vivax* Malaria. *PLoS Med*. 2007; 4: e350. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040350> PMID: 18092888
12. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. *Am J Prev Med*. 2015; 49: S319–S333. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.09.011> PMID: 26590432
13. Mueller I, Shakri AR, Chitnis CE. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*. 2015; 33: 7489–7495. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.040> PMID: 26429453
14. Beeson JG, Kurtovic L, Dobafo C, Opi DH, Chan JA, Feng G, et al. Challenges and strategies for developing efficacious and long-lasting malaria vaccines. *Sci Transl Med*. 2019; 11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau1458> PMID: 30626712
15. Adams JH, Hudson DE, Torii M, Ward GE, Wellemis TE, Alewa M, et al. The duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell*. 1990; 63: 141–153. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90295-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90295-p) PMID: 2170017
16. Adams JH, Simi BKIMLEE, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Microbiology*. 1992; 89: 7085–7089. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.7085> PMID: 1498004
17. Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol*. 1999; 69: 340–350. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(99\)0083-0](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(99)0083-0) PMID: 2680588
18. Michon P, Fraser T, Adams JH. Naturally Acquired and Vaccine-Elicited Antibodies Block Erythrocyte Cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. *Mansfield JM, editor. Infect Immun*. 2000; 68: 3164–3171. <https://doi.org/10.1128/AID.68.6.3164-3171.2000> PMID: 10816459
19. King CL, Michon P, Shakri AR, Marcolty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105: 8363–8368. <https://doi.org/10.1073/pnas.080071105> PMID: 18523022
20. Caravolo IP, Souza-Silva FA, Fontes C-JF, Braga EM, Madureira AP, Kretz AU, et al. Inhibitory Properties of the Antibody Response to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein in an Area with Unstable Malaria Transmission. *Scand J Immunol*. 2008; 67: 270–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02059.x> PMID: 18224014
21. Souza-Silva FA, Da Silva-Nunes M, Sanchez BAM, Caravolo IP, Malafonte RS, Brito CFA, et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in rural Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82: 185–193. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.08-0580> PMID: 20133980
22. Souza-Silva FA, Torres LM, Santos-Alves JF, Tang ML, Sanchez BAM, Sousa TN, et al. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) immunity. *PLoS One*. 2014; 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099792> PMID: 24710306
23. Nicoletti VC, Frischmann S, Barbosa S, King CL, Ferreira MU. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. *J Infect Dis*. 2018; 214: 1539–1546. <https://doi.org/10.1093/infdis/jw407> PMID: 27578890
24. Hester J, Chan ER, Menard D, Mercereau-Pujalon O, Barnwell J, Zimmerman PA, et al. De Novo Assembly of a Field Isolate Genome Reveals Novel *Plasmodium vivax* Erythrocyte Invasion Genes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002569> PMID: 24340114
25. Niumngia FB, Thomson-Luque R, de Menezes Torres L, Gunalan K, Carvalho LH, Adams JH. A novel erythrocyte binding protein of *Plasmodium vivax* suggests an alternate invasion pathway into duffy-positive reticulocytes. *MBio*. 2016; 7: 1–5. <https://doi.org/10.1128/mBio.01261-16> PMID: 27565313
26. Franca CT, White MT, He WQ, Hostetler JB, Brewster J, Fialo G, et al. Identification of Highly-Protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. *Elife*. 2017; 6: 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.29073> PMID: 28949293
27. He W-Q, Shakri AR, Bhardwaj R, Franca CT, Stanisic DI, Hester J, et al. Antibody responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated



- with protection from clinical Malaria. Sillis P, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13: e0006987. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006987> PMID: 30709655
28. Tsuboi T, Kappe SHI, Al-Yaman F, Prickett MD, Alpers M, Adams JH. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun*. 1994; 62: 5581–5586. <https://doi.org/10.1128/iai.62.12.5581-5586.1994> PMID: 7360140
  29. Cole-Tobian J, King CL. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 127: 121–132. [https://doi.org/10.1016/s0169-6851\(02\)00327-4](https://doi.org/10.1016/s0169-6851(02)00327-4) PMID: 12872921
  30. Sousa TN, Tarazona-Santos EM, Wilson DJ, Madureira AP, Faibo PR, Fontes CJ, et al. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J*. 2010; 9: 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-1> PMID: 20043863
  31. Ceravolo IP, Sanchez BAM, Sousa TN, Guerra BM, Soares IS, Braga EM, et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clin Exp Immunol*. 2009; 156: 502–510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03931.x> PMID: 19438604
  32. Cole-Tobian JL, Michon P, Blason M, Richards JS, Beeson JG, Mueller I, et al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous *Plasmodium vivax* strains in Papua New Guinean children. *Infect Immun*. 2009; 77: 4009–4017. <https://doi.org/10.1128/IAI.00158-09> PMID: 19564378
  33. Ntumngia FB, Pires C V., Barnes SJ, George MT, Thomson-Luque R, Kano FS, et al. An engineered vaccine of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. *Sci Rep*. 2017; 7: 13779. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13991-2> PMID: 29062081
  34. Han JH, Cho JS, Ong JJY, Park JH, Myunt MH, Sutanto E, et al. Genetic diversity and neutral selection in *Plasmodium vivax* erythrocyte binding protein correlates with patient antigenicity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14: 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008202> PMID: 32645066
  35. Cerbino VDA, Zumpano JF, Leopoldo FL et al. Follow-up of control measures during the *P. vivax* malaria outbreak in Rio Manso, Minas Gerais. *Rev Bras Med Trop* 2004; 37: 269.
  36. Zumpano J. Estudo Das Recaldas No Surto De Malária Por *Plasmodium vivax* No Distrito De Sousa, Município de Rio Manso, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Med Trop*. 2004.
  37. Kano FS, Sanchez BAM, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: Baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Heal*. 2012; 17: 989–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2012.03016.x> PMID: 22643072
  38. Ntumngia FB, Adams JH. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19: 30–36. <https://doi.org/10.1128/CVI.05466-11> PMID: 22116684
  39. Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RL, Ferreira OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malar J*. 2003; 2: 39. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-2-39> PMID: 14617370
  40. Kano FS, Souza-Silva FA, Torres LM, Lima BAS, Sousa TN, Alves JRS, et al. The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10: 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005177> PMID: 27959918
  41. Medeiros CMP, Moreira EJM, Pires C V., Torres LM, Guimarães LFF, Alves JRS, et al. Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. *PLoS One*. 2020; 15: 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232796> PMID: 32379804
  42. Weiss GE, Cribb BS, Gilson PR. Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. *Trends Parasitol*. 2016; 32: 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.007> PMID: 26778295
  43. Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of Erythrocytes by Malaria Merozoites. *Science* (80-). 1975; 187: 748–750. <https://doi.org/10.1126/science.803712> PMID: 803712
  44. Singh SK, Hota R, Belhail H, Chitnis CE, Sharma A. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature*. 2006; 439: 741–744. <https://doi.org/10.1038/nature04443> PMID: 16372920
  45. Cowman AF, Cribb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell*. 2006; 124: 755–766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006> PMID: 16497586



## ANEXO I - Questionário aplicado aos indivíduos participantes do estudo



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

**Data** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Paciente N<sup>o</sup> \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_

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

Município de Residência \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Telefone de contato \_\_\_\_\_

No momento da coleta:

Malária aguda (1) sim (2) não (3) duvidoso Espécie: \_\_\_\_\_

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

Resultado da lâmina: \_\_\_\_\_ parasitemia \_\_\_\_\_

Você teve malária (1) sim (2) não (3) duvidoso

Quantas vezes? \_\_\_\_\_

Espécie da última malária? (1) *P.vivax* (2) *P.falciparum* (3) não sabe (9) não se aplica

Quando foi sua última malária? \_\_\_\_\_

Teve Sintomas (1) sim (2) não Quais? \_\_\_\_\_

Você concluiu o tratamento (1) sim (2) não (3) não sabe (9) não se aplica

Há quanto tempo \_\_\_\_\_

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

Se sim, por quanto tempo? \_\_\_\_\_

Município de contágio? \_\_\_\_\_

Como você pegou malária? \_\_\_\_\_

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

Há quantos anos você reside nessa área? \_\_\_\_\_

Apresentou nos últimos cinco anos, alguma doença grave?

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

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

Está gripado ou com alguma infecção?

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

Sinais/sintomas? \_\_\_\_\_

Está fazendo uso de algum medicamento?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe

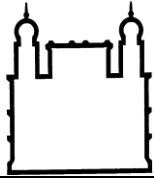
Se sim, qual? \_\_\_\_\_

Se sim, há quanto tempo \_\_\_\_\_

Você sabe como transmite a malária? \_\_\_\_\_

Obs: \_\_\_\_\_

## ANEXO II - Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes do estudo



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

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

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

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

Você ou sua comunidade não terão nenhum benefício direto e imediato relacionado a esta

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

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

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

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

---

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

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

Sousa, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

---

Nome do voluntário da pesquisa

---

Assinatura do voluntário

## ANEXO III – Lista de gene avaliados no PCRarray

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>
APCS	Amyloid P component, serum
C3	Complement component 3
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
CCR6	Chemokine (C-C motif) receptor 6
CCR8	Chemokine (C-C motif) receptor 8
CD14	CD14 molecule
CD4	CD4 molecule
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
CD40LG	CD40 ligand
CD80	CD80 molecule
CD86	CD86 molecule
CD8A	CD8a molecule
CRP	C-reactive protein, pentraxin-related
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCR3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FOXP3	Forkhead box P3
GATA3	GATA binding protein 3
HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A
HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IFNA1	Interferon, alpha 1
IFNAR1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1
IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
IFNG	Interferon, gamma
IFNGR1	Interferon gamma receptor 1
IL10	Interleukin 10
IL13	Interleukin 13
IL17A	Interleukin 17A
IL18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
IL1A	Interleukin 1, alpha
IL1B	Interleukin 1, beta
IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I
IL2	Interleukin 2
IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19
IL4	Interleukin 4
IL5	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
CXCL8	Interleukin 8
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IRF7	Interferon regulatory factor 7

ITGAM	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
JAK2	Janus kinase 2
LY96	Lymphocyte antigen 96
LYZ	Lysozyme
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8
MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble
MPO	Myeloperoxidase
MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
RAG1	Recombination activating gene 1
RORC	RAR-related orphan receptor C
SLC11A1	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced
TBX21	T-box 21
TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1
TLR1	Toll-like receptor 1
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR3	Toll-like receptor 3
TLR4	Toll-like receptor 4
TLR5	Toll-like receptor 5
TLR6	Toll-like receptor 6
TLR7	Toll-like receptor 7
TLR8	Toll-like receptor 8
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TYK2	Tyrosine kinase 2
ACTB	Actin, beta
B2M	Beta-2-microglobulin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
HGDC	Human Genomic DNA Contamination
RTC	Reverse Transcription Control
RTC	Reverse Transcription Control
RTC	Reverse Transcription Control
PPC	Positive PCR Control
PPC	Positive PCR Control
PPC	Positive PCR Control