

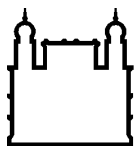
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DAS PROTEÍNAS DE
SUPERFÍCIE DO MEROZOÍTO DE LIGAÇÃO AO DUFFY 1 E 2
(MSPDBL-1 E MSPDBL-2) DE *Plasmodium falciparum* E O SEU
IMPACTO NOS EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES DE CÉLULAS B E T
EM ÁREAS ENDÊMICAS BRASILEIRAS DE MALÁRIA

JULIANA ALINE DE SOUZA LEMOS

Rio de Janeiro
Agosto de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JULIANA ALINE DE SOUZA LEMOS

Avaliação do polimorfismo genético das Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 E MSPDBL-2) de *Plasmodium falciparum* e o seu impacto nos epítomos imunodominantes de células B e T em áreas endêmicas brasileiras de malária

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

Orientadora: Prof. Dra. Lilian Rose Pratt-Riccio

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2021

Souza Lemos, Juliana Aline.

Avaliação do polimorfismo genético das Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 E MSPDBL-2) de *Plasmodium falciparum* e o seu impacto nos epítomos imunodominantes de células B e T em áreas endêmicas brasileiras de malária / Juliana Aline Souza Lemos. - Rio de Janeiro, 2021.

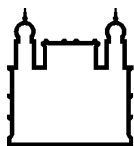
128 f.

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

Orientadora: Lilian Rose Pratt- Riccio.

Bibliografia: f. 70-83

1. Malária. 2. *Plasmodium falciparum* . 3. Polimorfismo genético. 4. MSPDBL-1 e -2. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: JULIANA ALINE DE SOUZA LEMOS

Avaliação do polimorfismo genético das Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 E MSPDBL-2) de *Plasmodium falciparum* e o seu impacto nos epítomos imunodominantes de células B e T em áreas endêmicas brasileiras de malária

ORIENTADORA: Profa. Dra. Lilian Rose Pratt-Riccio

Aprovada em: 26/08/2021

EXAMINADORES:

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

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

Prof. Dr. Gustavo Capatti Cassiano – Global Health and Tropical Medicine, Tropical Medicine and Hygiene Institut, Lisboa University

Prof. Dra. Luciane Moreno Storti-Melo – Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dra. Daiana da Souza Perce-da-Silva – Universidade de Medicina de Petrópolis

Rio de Janeiro, 26 de Agosto de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Juliana Aline de Souza Lemos**, sob orientação da Dr^a. Lilian Rose Pratt Riccio. Ao vigésimo sexto dia do mês de agosto de dois mil e vinte e um, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **"Avaliação do polimorfismo genético das Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL – 1 e MSPDBL – 2) de Plasmodium falciparum e o seu impacto nos epítomos imunodominantes de células B e T em áreas endêmicas brasileiras de malária"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia e Patogênese de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Dalma Maria Banic – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado– UFF/RJ, Dr. Gustavo Capatti Cassiano – IHMT/LISBOA, e como suplentes: Dr^a. Luciane Moreno Storti de Melo- UFS/SE e Dr^a. Daiana da Souza Perce da Silva - UNIFASE/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 26 de agosto de 2021.

Dr^a. Dalma Maria Banic (Presidente da Banca):

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

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

Aos meus amados pais, Carlos e Carmen,
por todo amor e dedicação a mim.
As minhas queridas irmãs, Gabriela e Rayssa,
pela irmandade e amizade incondicional.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pelo dom da vida, da sabedoria, da perseverança e do amor:

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

A doutora *Lilian Rose Pratt-Riccio*, pela orientação, por acreditar no meu potencial, me incentivar, aconselhar, me acalmar todas as vezes que eu surtei e por todo o apoio nesses dois anos. Sou extremamente grata pela confiança, por todos os ensinamentos que contribuíram profundamente para o meu crescimento pessoal e profissional e principalmente por ser a melhor orientadora que eu poderia ter escolhido!

Ao doutor *Claudio Tadeu Daniel Ribeiro*, por me receber tão gentilmente em seu Laboratório.

Aos demais pesquisadores do LPM: *Fátima Cruz*, *Leonardo Carvalho*, *Paulo Totino* e *Flávia Gomes*, pelo conhecimento, companheirismo e dicas científicas ao longo desses anos.

Aos meus amados pais, *Carlos Eduardo Freitas Lemos* e *Carmen Lucia de Souza Lemos*, por serem a minha eterna fonte de inspiração e por toda dedicação, suporte e amor a mim oferecido durante toda vida. Obrigada por sempre incentivarem o caminho do estudo e do trabalho. Vocês são a minha base.

Às minhas irmãs *Gabriela Layse de Souza Lemos* e *Rayssa Helena de Souza Lemos*, pelo amparo, amor, amizade e pela certeza de que não importa o que aconteça, vocês estarão sempre comigo dispostas a ajudar e me aconselhar.

À minha avó, *Layse Freitas Lemos (in memoriam)* e meu tio *Luiz Cláudio Lemos* por me darem abrigo e um lar no Rio de Janeiro. Por todo cuidado, amor e companheirismo que sempre me foi dado nos meus 2 anos aqui.

À doutoranda *Bárbara Baptista*, a quem muito carinhosamente eu chamo de “minha doutoranda”. Você foi a minha companheira fiel nesse período de mestrado. Dividimos viagens, almoços, festas, dias e mais dias de trabalho no laboratório. Muito obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, por todas as vezes que ficou comigo até tarde trabalhando e pela ajuda imensa nos experimentos!

Aos Doutores *Dalma Maria Banic, Ricardo Luiz Dantas Machado, Simone da Silva Santos, Gustavo Capatti Cassiano e Daiana de Souza Perce-da-Silva* por terem aceitado gentilmente o convite para participar da banca dessa dissertação.

Ao doutor *Rodrigo Nunes* pelo auxílio na predição dos epítomos B e T.

Ao doutor *Daniel Carvalho* pelo auxílio no desenho dos *primers*.

A doutoranda, *Lana Bittencourt Chaves* pela ajuda nas análises de diversidade genética e por esclarecer quaisquer dúvidas que apareceram no meu caminho.

Aos membros da equipe de trabalho de campo, Doutores *Lilian Rose Pratt Riccio, Evelyn Kety Pratt Riccio, Josué da Costa Lima Junior*, graduanda *Ana Beatriz Lopes de Souza*, doutorandos *Hugo Amorim, Bárbara Baptista* e a mestranda *Jenifer Peixoto Barros* pelo excelente trabalho de campo que possibilitou a realização dessa dissertação.

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

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

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

Aos colaboradores *Rodrigo Medeiros e Josué da Costa Lima-Junior*, por toda ajuda e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos, *Bárbara Baptista, Beatriz Rodrigues, Carolina Blanco, Hugo Amorim e Jéssica Watermann*, companheiros de laboratório e da vida que se tornaram grandes amigos. Obrigada por compartilharem alegrias e aflições, por me ajudarem sempre que eu precisei e por tornarem a vida mais leve e divertida. Vocês são a minha segunda família aqui no Rio.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Malária: *Aline, Ana Beatriz, Carina, Claudinha, Daiana, Fabiana, Fátima, Guilherme, Lucas Tavares, Luciana, Marcos, Marília, Pamela, Rebecca, Luana* e *Jennifer* pela amizade, apoio e carinho durante todo esse tempo e que foram indispensáveis para realização desse trabalho;

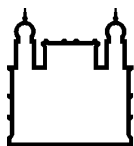
Aos *professores* do Curso de Pós-graduação, pelos conhecimentos adquiridos e pelas valiosas discussões.

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

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

“Não basta a pesquisa sem maravilhar-se,
..., o trabalho sem a piedade, a ciência
sem a caridade, a inteligência sem a
humildade, o estudo sem a graça”

São Boaventura



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DO MEROZOÍTO DE LIGAÇÃO AO DUFFY 1 E 2 (MSPDBL-1 E MSPDBL-2) DE *Plasmodium falciparum* E O SEU IMPACTO DOS EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES DE CÉLULAS B E T EM ÁREAS ENDÊMICAS BRASILEIRAS DE MALÁRIA

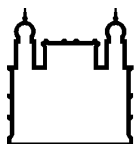
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Juliana Aline de Souza Lemos

A malária é uma doença causada por protozoário do gênero *Plasmodium*. Estima-se que ocorram 229 milhões de casos e 409 mil mortes decorrente da malária, a maioria causada por *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). A infecção por essa espécie é preocupante no Brasil, principalmente após a descrição de isolados com susceptibilidade reduzida aos derivados de artemisinina no Suriname e Guiana Francesa, alertando para o risco de surgimento e introdução de resistência aos antimaláricos no Brasil. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina tem sido uma das principais estratégias para enfrentar esse problema. Entretanto, até o momento nenhuma vacina licenciada atingiu eficácia de 75%, tornando importante a busca de novos candidatos vacinais mais eficazes. A Proteína de Superfície do Merozoíto de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 e a MSPDBL-2) são duas proteínas que se ligam diretamente a Proteína da Superfície do Merozoíto 1 (MSP-1) na superfície do parasito, formando um complexo na superfície do eritrócito através do seu Domínio de Ligação ao Duffy (DBL) facilitando a invasão do *P. falciparum* no eritrócito. Considerando que a extensiva diversidade genética exibida pelo *P. falciparum* é um fator importante para a evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro, acreditamos que a presença de polimorfismos nas regiões genéticas que codificam as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 pode modular as respostas imune celular e humoral específicas. Assim, nos propomos a identificar polimorfismos genéticos e avaliar o impacto desses polimorfismos nas regiões potencialmente antigênicas no DBL e no Antígeno Polimórfico Secretado Associado com Merozoítos (SPAM) das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em isolados de *P. falciparum* que circulam em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará) por meio de ferramentas de predição *in silico*. Nossos estudos mostraram uma maior diversidade genética na região gênica que codifica a MSPDBL-1 quando comparada a MSPDBL-2, principalmente na região gênica que codifica o domínio DBL. Análise de predição *in silico* de epítomos B e T imunodominantes, considerando a sequência referência 3D7, evidenciaram 15 epítomos de células B e 14 epítomos de células T que são reconhecidos com frequência de 50 a 82 % dos Antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e que a presença desses polimorfismos parece impactar nos epítomos T e B imunodominantes das MSPDBL-1 e MSPDBL-2. Nossos dados ressaltam que avaliar polimorfismos genéticos em regiões que codifiquem epítomos imunodominantes é um ponto crucial

no desenvolvimento de uma vacina antimalária pelo potencial de geração de mecanismos de escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF GENETIC POLYMORPHISM OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* MEROZOITE SURFACE PROTEINS DUFFY BINDING-LIKE 1 AND 2 (MSPDBL-1 AND MSPDBL-2) AND ITS IMPACT ON B AND T CELLS ON IMMUNODOMINANT EPITOPES ON BRAZILIAN MALARIA ENDEMIC AREAS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Juliana Aline de Souza Lemos

Malaria is a disease caused by a protozoan of the genus *Plasmodium*. There are an estimated 229 million cases and 409,000 deaths from malaria, most of them caused by *P. falciparum* infection. Infection by this species is of concern in Brazil, especially after isolates with reduced efficacy to artemisinin derivatives were described in Suriname and French Guiana, warning of the risk of emergence and introduction of antimalarial drug resistance in Brazil. In this context, the development of a vaccine has been one of the main strategies to address this problem. However, so far, no licenced vaccine has achieved 75% efficacy, making it important to search for new, more effective vaccine candidates. Merozoite Surface Protein Duffy Binding-like -1 and -2 (MSPDBL-1 and MSPDBL-2) are two proteins that bind directly to MSP-1 on the surface of the parasite, forming a complex on the erythrocyte surface through its DBL domain facilitating the invasion of *P. falciparum* into the erythrocyte. Considering that the extensive genetic diversity exhibited by *P. falciparum* is an important factor for the parasite's evasion of the host immune system, we believe that the presence of polymorphisms in the genetic regions encoding the MSPDBL-1 and MSPDBL-2 proteins may modulate specific cellular and humoral immune responses. Therefore, we propose to identify genetic polymorphisms and to evaluate the impact of these polymorphisms on the potentially antigenic regions in the Duffy Binding-like (DBL) and Secreted Polymorphic Antigen Associated with Merozoite (SPAM) domains of the MSPDBL-1 and MSPDBL-2 proteins in *P. falciparum* isolates circulating in malaria endemic areas of the Brazilian Amazon (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima and Guajará) using *in silico* prediction tools. Our studies showed a higher genetic diversity in the gene region encoding MSPDBL-1 when compared to MSPDBL-2, mainly in the gene region encoding the DBL domain. *In silico* prediction analysis of immunodominant B and T epitopes, considering the 3D7 reference sequence, evidenced 15 B cell epitopes and 14 T cell epitopes that are recognized at a frequency of 50 to 82 % of the Major Histocompatibility Complex Antigens and that the presence of these polymorphisms seems to impact the immunodominant T and B epitopes of MSPDBL-1 and MSPDBL-2. Our data highlight that evaluating genetic polymorphisms in regions encoding immunodominant epitopes is a crucial point in the malaria vaccine development because of its potential to generate mechanisms of parasite escape from the host immune system.

RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária	1
1.2 Malária no Brasil	3
1.3 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.	5
1.3.1 Ciclo no homem.....	5
1.3.2 Ciclo no mosquito.....	6
1.4 Dificuldades na busca da vacina antimalárica para <i>P. falciparum</i> 8	
1.5 Proteínas da Superfície de Merozoítas (MSPs)	14
1.6 Proteína de Superfície do Merozoíta de ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 e MSPDBL-2)	16
1.7 Resposta imune associada ao HLA	19
1.8 Justificativa	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Área de estudo	24
3.2 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários	25
3.2.1 Critérios de inclusão.....	25
3.2.2 Critérios de exclusão.....	25
3.3 Aspectos éticos	26
3.4 Coleta de dados pessoais e epidemiológicos	26
3.5 Coleta e processamento das amostras de sangue	26
3.6 Diagnóstico	27
3.6.1 Diagnóstico parasitológico.....	27
3.6.2 Diagnóstico molecular.....	27
3.7 Extração de DNA	27
3.8 Desenho dos iniciadores específicos para MSPDBL-1 e MSPDBL-228	
3.9 Reação em cadeia da polimerase – PCR	28

3.10	Reação de sequenciamento	30
3.11	Análise dos polimorfismos.....	31
3.12	Modelagem 3D das MSPDBL-1 e MSPDBL-2	32
3.13	Predição <i>in silico</i> de epítomos de células B e células T	32
3.14	Análise dos dados epidemiológicos	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Descrição da população estudada.....	34
4.2	Caracterização molecular das MSPDBL-1 e 2.....	34
4.2.1	Amplificação dos genes das MSPDBL-1 e MSPDBL-2 por PCR	34
4.2.2	Análise do polimorfismo genético da MSPDBL-1 em isolados brasileiros por meio da reação de sequenciamento	37
4.2.3	Análise do polimorfismo genético da MSPDBL-2 em isolados brasileiros por meio da reação de sequenciamento	42
4.3	Frequência de variantes encontradas na população de estudo	44
4.4	Análise genética da população	49
4.5	Substituições de aminoácidos das MSPDBL-1 e MSPDBL-2 nos isolados brasileiros.....	51
4.6	Modelagem molecular e predição de epítomos de células B e T	55
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	68
7	PERSPECTIVAS	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9	ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial da malária.	1
Figura 2 - Distribuição geográfica do <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> em 2017.....	3
Figura 3 - Mapa de risco de malária por município de infecção.	4
Figura 4 - Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> spp.....	7
Figura 5 - Estágios-alvo para candidatos vacinais.	12
Figura 6 - Representação esquemática das proteínas envolvidas no processo de invasão do merozoíto no eritrócito.	16
Figura 7 - Estrutura das proteínas MSPDBL-1 e 2, MSP-3 e EBL.....	19
Figura 8 - Mapa geográfico com a localização das áreas de estudo.....	24
Figura 9 - Amplificação por PCR do domínio SPAM do gene <i>pfmspdbl1</i>	35
Figura 10 - Amplificação por PCR do domínio DBL do gene <i>pfmspdbl1</i>	35
Figura 11 - Amplificação por PCR do domínio SPAM do gene <i>pfmspdbl2</i>	36
Figura 12 - Amplificação por PCR do domínio DBL do gene <i>pfmspdbl2</i>	36
Figura 13 - Análise da diversidade genética do domínio SPAM do <i>pfmspdbl1</i> nos isolados de <i>P. falciparum</i> coletados em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará....	38
Figura 14 - Análise da diversidade genética do domínio SPAM do gene <i>pfmspdbl1</i> por localidade	38
Figura 15 - Análise da diversidade genética do domínio SPAM da <i>pfmspdbl1</i> nos isolados de <i>P. falciparum</i>	40
Figura 16 - Análise da diversidade genética do domínio DBL do gene <i>pfmspdbl1</i> por localidade	41
Figura 17 - Frequência de mutações do gene <i>pfmspdbl1</i>	42
Figura 18 – A) Análise da diversidade genética do domínio SPAM do <i>pfmspdbl2</i> nos isolados de <i>P. falciparum</i> coletados em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará. B - D Frequência das mutações observadas por localidade.....	43
Figura 19 - Frequência das variantes por localidade SPAM MSPDBL-1	45
Figura 20 - Frequência das variantes por localidade DBL MSPDBL-1	47
Figura 21 - Frequência das variantes por localidade SPAM da MSPDBL-2.....	47
Figura 22 - Frequência das variantes por localidade DBL da MSPDBL-2	48
Figura 23 - Estrutura de modelagem e análise <i>in silico</i> de epítomos das MSPDBL-1 e MSPDBL-2.	55
Figura 24 - Estrutura dos genes <i>pfmspdbl1</i> e <i>pfmspdbl2</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais antígenos plasmodiais candidatos a vacina antimalárica.....	13
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação dos genes MSPSBL1 e MSPDBL2	29
Tabela 3 - Alternância de temperaturas dos ciclos para a amplificação	29
Tabela 4 - Mutações encontradas no domínio SPAM do gene <i>pfmspdbl1</i> : posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos.....	37
Tabela 5 - Mutações encontradas no domínio DBL no gene <i>pfmspdbl1</i> : posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos	39
Tabela 6 - Mutações encontradas no domínio SPAM do gene <i>pfmspdbl2</i> : posição dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos	43
Tabela 7 - Mutações encontradas no domínio DBL do gene <i>pfmspdbl2</i> : posição dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos	44
Tabela 8 - Comparação da diversidade genética entre os domínios DBL e SPAM do gene <i>pfmspdbl1</i>	Erro! Indicador não definido.
Tabela 9 - Diversidade genética do gene <i>pfmspdbl1</i>	Erro! Indicador não definido.
Tabela 10 - Comparação da diversidade genética entre os domínios DBL e SPAM do gene <i>pfmspdbl2</i>	Erro! Indicador não definido.
Tabela 11 - Diversidade genética do gene <i>pfmspdbl2</i>	Erro! Indicador não definido.
Tabela 12 - Epítomos de células B lineares preditos	58
Tabela 13 - Epítomos de células T lineares preditos	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A - Adenina

ACT – Terapia combinada a base de Artemisinina

BLAST – Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico / *Basic Local Alignment Search Tool*

C - Citosina

CSP – Proteína do Circumesporozoíto

CZS – Cruzeiro do Sul

DBL – Domínio de Ligação ao Antígeno Duffy / *Duffy Binding Like*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EBA – Antígeno de ligação ao eritrócito

GJ – Guajará

G - Guanina

GLURP – Proteína Rica em Glutamato

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEDB – Banco de Dados de Epítomos Imunes / *Immune Epitope Database*

IPA – Índice Parasitário Anual

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

ML – Mâncio Lima

mL – Mililitros

min – Minutos

µL - Microlitros

MS – Ministério da Saúde

MSP – Proteína de Superfície de Merozoíto

MSPDBL – Proteína de Superfície do Merozoíto de ligação ao Duffy / *Merozoite Surface Protein Duffy Binding Like*

NCBI – Centro Nacional de Informações para Biotecnologia / *National Center for Biotechnology Information*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pb – Pares de base

pfRh – Proteínas homólogas de Reticulócitos de *P. falciparum*

SNPs – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SPAM – Antígeno polimórfico secretado associado com merozoítos / *Secreted polymorphic antigen associated with merozoites*

T - Timina

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença infecto-parasitária de elevada prevalência e morbidade causada por protozoários do gênero *Plasmodium* (Apicomplexa: Plasmodiidae). Existem mais de 250 espécies de *Plasmodium* que infectam outros animais como aves, lagartos, cobras e mamíferos (1), entretanto somente sete espécies parasitam naturalmente o homem: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *P. vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *P. malariae* (Laveran, 1881), *P. ovale* (Stephens, 1922), *P. knowlesi* (White, 2008), *P. cynomolgi* (Ta et al., 2014) e *P. simium* (Brasil et al., 2017). A transmissão da malária se dá através da picada do inseto vetor, fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, no qual o *An. darlingi* é a principal espécie transmissora no Brasil (2–4). Na região extra-amazônica as espécies *An. cruzii* e *An. bellator* atuam como principais vetores de importância epidemiológica na chamada malária de bromélias (5) e *An. aquasalis* que atua como vetor secundário (6).

Apesar de avanços no seu controle, a malária apresenta grande impacto na saúde pública, possuindo distribuição global, estando presente em 91 países das regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo endêmica na África, Ásia, Oceania e Américas (figura 1) e pondo em risco cerca de 61 % da população mundial (7).

No ano de 2019 foram registrados 229 milhões de novos casos de malária e 409 mil mortes, a maioria dessas em crianças menores de 5 anos de idade (7). As mortes por malária são, em sua maioria causadas por *P. falciparum* (99,7%), a espécie mais prevalente e patogênica, comumente associado as formas graves e mortalidade.

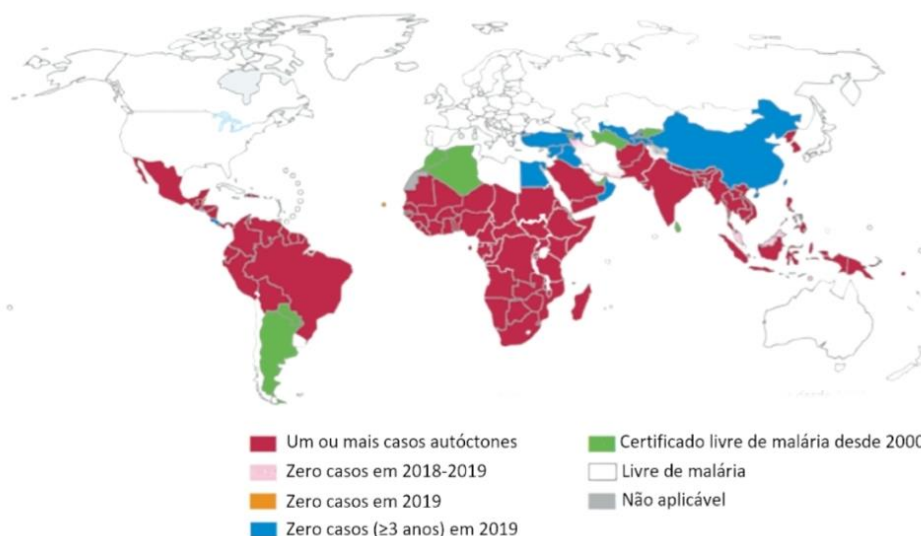


Figura 1 - Distribuição mundial da malária.

Fonte: WHO, 2020

O continente Africano é o que mais padece sob o peso dessa doença. Aproximadamente 94% dos casos e mortes por malária no mundo ocorrem na África, seguido do Sudeste Asiático (3%) e da região do Mediterrâneo Oriental. As Américas contribuem expressamente com aumento mundial dos números de casos de malária. Estratégias de controle da doença, tais como o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, pulverização das paredes internas das residências e terapia preventiva intermitente, tem obtido sucesso em mitigar o número de casos e mortes nas Américas, entretanto o progresso nessa região tem sido afetado pelo crescente número de casos na Venezuela em 2019. Cerca de 139 milhões de pessoas em 18 países das Américas vivem expostas ao risco de contrair malária e três países contabilizam aproximadamente 90% de todos os casos reportados na América: Colômbia, Brasil e Venezuela. Em 2019, o Brasil contribuiu com cerca de 22% dos casos de malária registrados nas Américas (7).

Das sete espécies de *Plasmodium* que infectam naturalmente o homem, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são as mais predominantes ao redor do mundo (figura 2). A malária por *P. falciparum* é mais prevalente em regiões da Ásia e no continente Africano, mais precisamente na região da África Subsaariana onde é responsável por 98% dos casos totais (8,9). O *P. vivax* apresenta distribuição geográfica mais ampla sendo mais prevalente nas regiões temperadas, tropicais e subtropicais, áreas onde a doença é endêmica, como por exemplo, Ásia, Oceania, América Central e América do Sul. A disposição geográfica dos parasitos pode variar muito, existindo regiões em que há apenas uma espécie de *Plasmodium* enquanto em outras regiões há a coexistência de mais espécies. Normalmente é observado uma sobreposição na distribuição geográfica de *P. vivax* e *P. falciparum*, com exceção dos países da África Subsaariana (9–11).

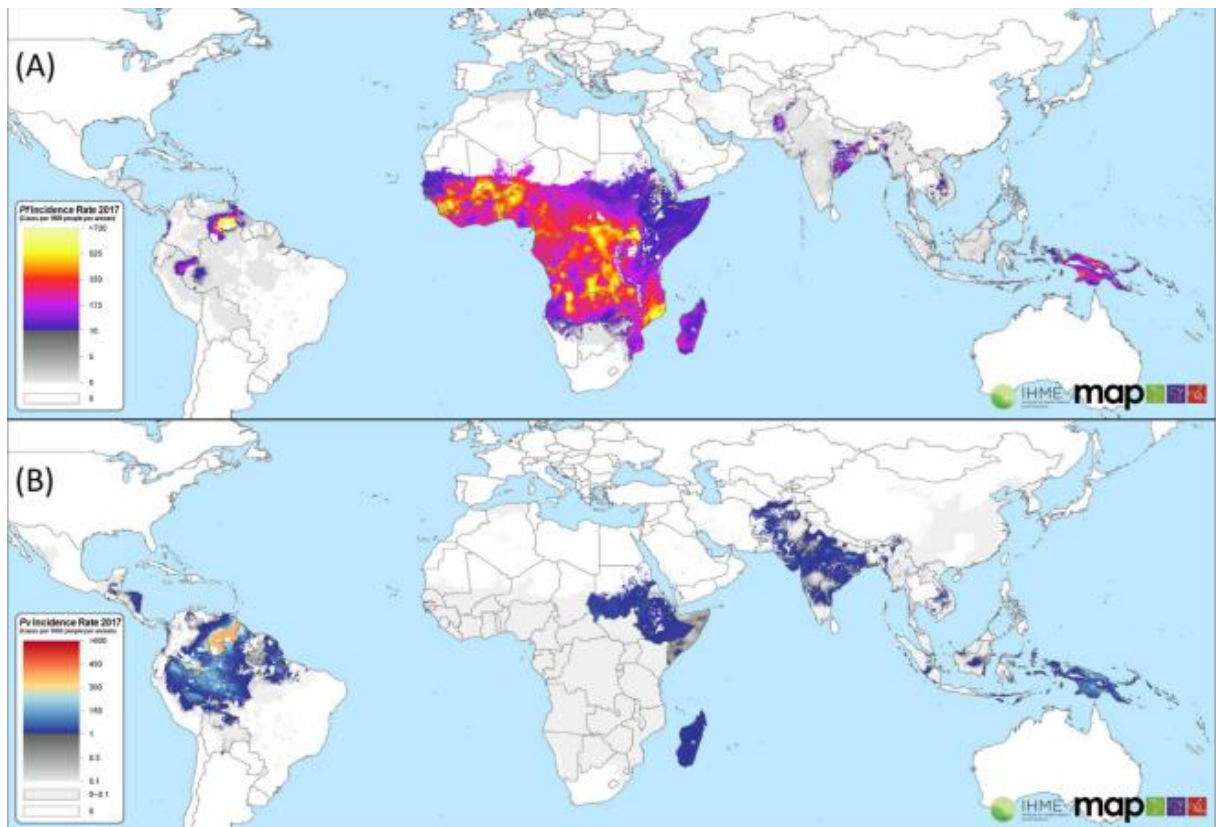


Figura 2 - Distribuição geográfica do *P. falciparum* e *P. vivax* em 2017. (A) Incidência do *P. falciparum* no globo em 2017 com prevalência na África Subsaariana, partes das Américas e Ásia. (B) Incidência do *P. vivax* no globo, mais prevalente nas Américas, Ásia e partes da África Subsaariana. Fonte: Price et al. 2020 (12)

1.2 Malária no Brasil

No Brasil, mais de 99% dos casos de malária notificados procedem da Amazônia Legal, área brasileira endêmica para a doença pertencente à bacia Amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (13). Na região extra-amazônica, 80% dos casos registrados de malária foram importados de estados amazônicos endêmicos ou de outros países em que ocorre a transmissão, porém são observados casos autóctones nessa região, principalmente em áreas de Mata Atlântica (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo) (13). No ano de 2019, foram notificados 157.454 casos de malária no Brasil, sendo 89,3% (141.127) dos casos autóctones de malária por *P. vivax* e 10,7% (16.327) dos casos por *P. falciparum* e malária mista (13). As mortes por malária têm diminuído consideravelmente desde 2005. Em 2019 foram registrados 37 óbitos, sendo 26 destes na região Amazônica e 11 na região extra-amazônica. A letalidade da malária na Amazônia é relativamente

baixa quando comparada a região extra-amazônica. Isso se deve ao fato dessa doença ser incomum em áreas que não são endêmicas e a demora da suspeição e tratamento adequado levando ao agravamento do quadro geral e conseqüentemente a morte do paciente (13).

O padrão de endemicidade da malária e o risco de contrair a doença é heterogêneo no Brasil. Esse risco é medido pelo Índice Parasitário Anual em que os municípios são categorizados em alto risco (IPA \geq 50 casos/1.000 habitantes), médio risco (IPA entre 10 e 50 casos/ 1.000 habitantes), baixo risco (IPA entre 1 de 10 casos/ 1.000 habitantes) e muito baixo risco (IPA $<$ 1 caso/1.000 habitantes). Na região amazônica, 36 municípios localizados em 6 dos 9 estados da Amazônia Legal (AC, AM, AP, PA, RO e RR) foram classificados como de alto risco no ano de 2019 (figura 3). Além da heterogeneidade, a sazonalidade da malária é diferente em cada estado da Amazônia e está relacionada com outros fatores que influenciam a proliferação de mosquitos como precipitação, temperatura, umidade e nível da água, propiciando picos sazonais de transmissão da malária no período de transição entre as estações úmida e seca. Dessa forma é comum observar surtos epidêmicos de acordo com as variações climáticas e socioambientais (13,14).

Apesar de o *P. falciparum*, principal causador dos casos graves e óbitos, ser proporcionalmente responsável por um número menor de casos (12%), a infecção por esta espécie é preocupante no Brasil, principalmente após a descrição de isolados com susceptibilidade reduzida a artemisinina (ACT) no Suriname e Guiana Francesa (15), alertando para o risco do surgimento e introdução de resistência no Brasil.

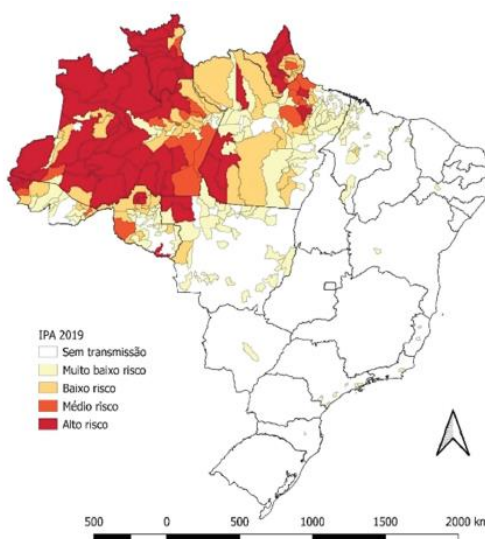


Figura 3 - Mapa de risco de malária por município de infecção.
Fonte: Ministério da Saúde, 2021.

1.3 Ciclo biológico do *Plasmodium* spp.

O ciclo biológico do plasmódio envolve dois hospedeiros (figura 4): um vertebrado onde ocorre reprodução assexuada que se divide em uma fase pré-eritrocítica e uma fase eritrocítica; e outro invertebrado onde ocorre a reprodução sexuada. O ciclo pode variar entre as espécies de parasitos e hospedeiros, porém mantém pontos semelhantes entre eles (16).

1.3.1 Ciclo no homem

A infecção malárica no homem se inicia quando fêmeas do mosquito *Anopheles* sp. infectadas com *Plasmodium* sp. inoculam os esporozoítos que estão localizados nas glândulas salivares durante o seu repasto sanguíneo (17). Uma vez injetados na derme, os esporozoítos podem permanecer viáveis na pele do hospedeiro por várias horas (18) até ativamente migrarem para vasos sanguíneos e vasos linfáticos (19). Os esporozoítos que seguem para os vasos linfáticos são transportados passivamente pela linfa até atingir os linfonodos onde podem se desenvolver em formas exoeritrocíticas, porém a grande maioria é degradado por células fagocíticas (18,20). Apenas os parasitos que atingem a corrente sanguínea são capazes de dar continuidade ao ciclo biológico, enquanto o restante parece servir como uma fonte de antígenos para o sistema imune adaptativo (21,22). Ao chegarem no fígado, as moléculas de adesão do parasito interagem com moléculas sulfatadas na superfície do hepatócito, permitindo a sua entrada na célula e resultando na formação de um vacúolo parasitóforo que circunda o esporozoíto, formado pela invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira (20,23). Um outro mecanismo de invasão dos esporozoítos é através da penetração dos hepatócitos através da sua capacidade de romperem a membrana da célula hospedeira e transpassarem diversos hepatócitos até chegarem definitivamente nos que servirão como célula hospedeira. Nesse momento, há a formação do vacúolo parasitóforo iniciando um processo de maturação e reprodução assexuada, dando origem a esquizontes hepáticos repletos de merozoítos (23–25). As células hepáticas são rompidas liberando milhares de merozoítos em vesículas chamadas de merossomos na corrente sanguínea que serão prontamente capazes de infectar os eritrócitos. Esse evento marca o fim da fase pré-eritrocítica (estágio hepático) do ciclo de vida do *Plasmodium* sp. Durante essa fase

do ciclo, a infecção é assintomática (26,27). No ciclo pré eritrocítico de algumas espécies como *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos não seguem para a corrente sanguínea e se desenvolvem em formas latentes dentro do hepatócito. Essas formas denominadas de hipnozoítos, são as responsáveis pela recidiva da malária (28).

Após a liberação dos merossomos na corrente sanguínea para a invasão dos eritrócitos, dá-se o início da fase eritrocítica. É nesse momento do ciclo que a sintomatologia característica da malária ocorre (29). A penetração do merozoíto no eritrócito é dependente de uma série de interações ligante-específicas e ocorre em diversas etapas. A invasão depende do reconhecimento e ligação inicial que envolve proteínas como MSPs (Proteína de Superfície do Merozoíto), EBA (Antígeno de Ligação ao Eritrócito) e PfRh (Proteínas Homólogas de Reticulócitos de *P. falciparum*). Após o reconhecimento, ocorre a reorientação apical do merozoíto em direção a membrana do eritrócito, seguida da formação da junção da membrana das duas células. Posteriormente, ocorre a invaginação da membrana do eritrócito, isolando o merozoíto em um vacúolo parasitóforo dentro do eritrócito (30). Uma vez no vacúolo parasitóforo, os merozoítos se diferenciam em trofozoíto jovem, trofozoíto maduro e esquizontes sanguíneos, que irá resultar na ruptura da membrana do eritrócito e liberação dos merozoítos que irão parasitar outros eritrócitos (26,29,31). O ciclo eritrocítico se repete periodicamente de 48 a 72 horas, dependendo da espécie plasmodial infectante, quando ocorre a ruptura dos eritrócitos os sintomas clínicos como febre, dor de cabeça, calafrios e mal-estar se fazem presentes (31).

Em cada ciclo de replicação uma pequena porção de merozoítos, ao invadirem o eritrócito, se diferenciam em formas eritrocíticas sexuadas chamados de gametócitos femininos (macrogametas) e gametócitos masculinos (microgametas), que, ao serem ingeridas pelo mosquito anofelino durante o repasto sanguíneo, darão início a fase sexuada ou esporogônica (32).

1.3.2 Ciclo no mosquito

Ao realizar o repasto sanguíneo, mosquitos do gênero *Anopheles* ingerem os gametócitos femininos e masculinos junto com os eritrócitos, além de outras formas do parasito. No intestino do mosquito, os eritrócitos se rompem e liberam os gametócitos no lúmen do intestino. A gametogênese é induzida pela redução da temperatura, aumento do pH e exposição ao ácido xanturênico. A fertilização ocorre com a fusão do macrogameta e microgameta resultando na formação do zigoto. O zigoto se desenvolve em um oocineto maduro móvel, que é capaz de atravessar o

epitélio intestinal do mosquito e alojar-se na membrana basal, onde perde a motilidade e secreta substâncias que o diferencia em oocisto (33,34). No interior do oocisto ocorre a diferenciação por esporogonia gerando milhares de esporozoítos no seu interior. Uma vez que o oocisto contém esporozoítos maduros e móveis, a sua parede é rompida pelo esporozoítos que são liberados na hemolinfa, que infectam as glândulas salivares do mosquito. A fêmea do *Anopheles* sp. ao realizar o repasto sanguíneo, irá inocular os esporozoítos no hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo (33,34).

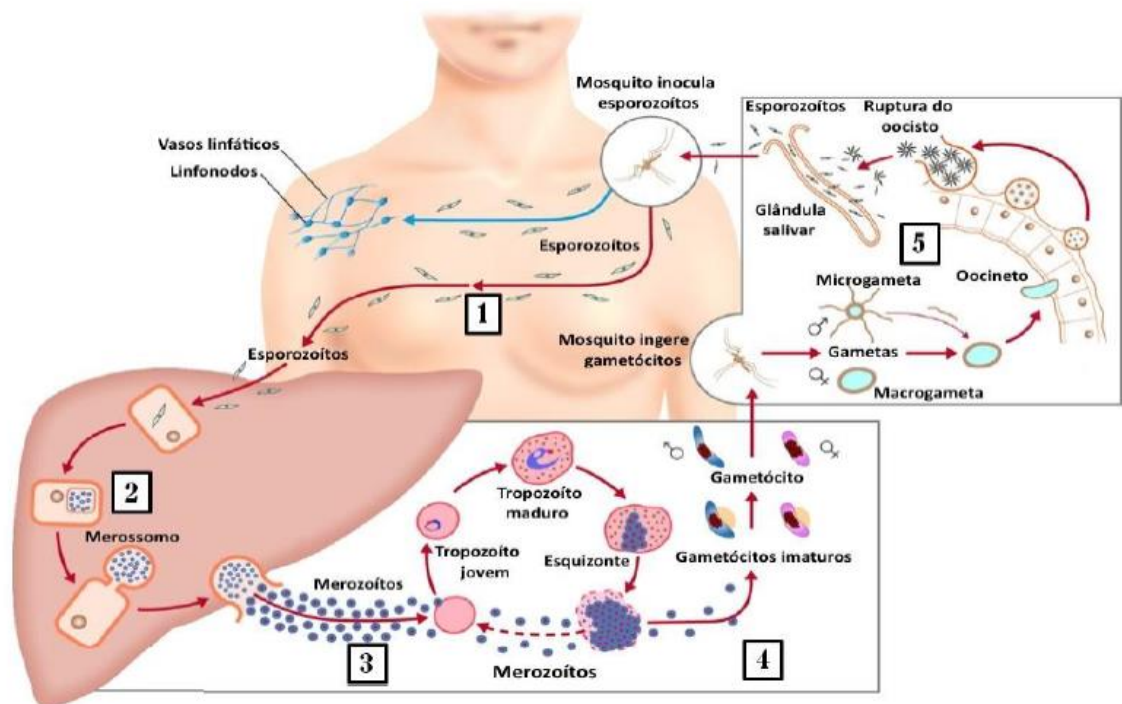


Figura 4 - Ciclo evolutivo do *Plasmodium* spp.

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

1.4 Dificuldades na busca da vacina antimalárica para *P. falciparum*

Apesar dos avanços no seu controle, fatores como a resistência dos parasitos aos antimaláricos, a dificuldade de fazer um diagnóstico rápido e a resistência do inseto vetor aos inseticidas dificultam o controle da doença. Dessa forma a busca por uma vacina antimalárica se torna a estratégia mais viável para substancialmente reduzir a morbidade e mortalidade dessa doença e caminhar para possível eliminação da malária no mundo.

A vacinação é a ferramenta mais eficaz e que apresenta melhor custo-benefício em promover a saúde pública e individual. Depois do fornecimento de água limpa e saneamento básico para a população, a vacinação em massa contra diversas doenças infecciosas foi o fator que mais contribuiu para a saúde pública global comparada a outros tipos de intervenção (35,36). Um exemplo claro é a erradicação da varíola em 1980 após o estabelecimento de programa global de vacinação nas áreas endêmicas da doença (37) e a implementação da vacina meningocócica na África Subsaariana como um ponto chave em conter as epidemias que ceifavam vidas no chamado cinturão da meningite (38). A busca por uma vacina que seja segura, efetiva e acessível contra a malária causaria grande impacto no controle da doença, pois ao contrário dos métodos já utilizados como diagnóstico e tratamento oportunos, esse método seria preventivo, assim como a utilização de mosquiteiros impregnados de inseticidas e vaporização residual com inseticidas.

A dificuldade para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica reside na complexidade do parasito, seu ciclo evolutivo, na limitada compreensão das interações parasito-hospedeiro e no alto nível de diversidade genética nas populações do *Plasmodium* sp. (35,39). Durante seu ciclo evolutivo, os plasmódios passam por diferentes estágios de desenvolvimento, expressando uma variedade de antígenos característicos de cada fase, capazes de induzir respostas imunes distintas (40). Essa complexidade gera um aumento nos antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica capaz de induzir uma resposta imune protetora. A recombinação homóloga que ocorre na gametogênese também pode ocasionar no aumento significativo de variabilidade genética da progênie facilitando a evasão do parasito do sistema imunológico do hospedeiro (35,41).

Apesar do caminho para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica ser tortuoso e desafiador, a convicção de que a formulação de uma vacina eficaz é viável deve-se ao fato de que a imunidade naturalmente adquirida contra a malária é capaz

de proteger contra a doença nas formas leve, moderada e severa (42). A maior evidência direta que anticorpos são importantes mediadores da imunidade vem de estudos de transferência passiva em que anticorpos de adulto imunes à malária foram usados com sucesso para tratar pacientes com malária (43,44). A possibilidade de vacinação contra a malária surgiu originalmente do sucesso de estudos realizados com esporozoítos atenuados por irradiação que permaneceram com a capacidade de invadir hepatócitos, porém não eram mais aptos a maturação e não desenvolviam merozoítos. O desafio com os esporozoítos irradiados levou a exposição de antígenos do estágio pré-eritrocítico capazes de induzir imunidade pré-eritrocítica (45–47). Outro fator que evidencia a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina antimalárica é o fato de que mesmo sem gerar imunidade estéril e duradoura (48), indivíduos moradores de áreas endêmicas apresentam imunidade clínica naturalmente adquirida e passageira após sucessivas e múltiplas infecções por *Plasmodium spp.* (49,50).

Considerando o complexo ciclo de vida do parasito, existem 3 estágios-alvo para um possível candidato vacinal: estágio pré-eritrocítico, estágio eritrocítico assexuado e estágio eritrocítico sexuado (51). É no primeiro alvo, o estágio pré-eritrocítico, que os esporozoítos migram pela corrente sanguínea até infectar e se multiplicar nos hepatócitos. O propósito do desenvolvimento de uma vacina com esse alvo é impedir a entrada e o desenvolvimento do parasito no hepatócito e assim limitar a invasão do eritrócito através de uma resposta de anticorpos que impediria a incursão na célula ou de células T que destruiriam os hepatócitos infectados (39,52). Um exemplo de vacina com essa abordagem é a RTS,S, a única vacina que alcançou ensaios clínicos de fase III. Essa vacina tem como alvo a proteína pré-eritrocítica circumesporozoíta (CSP) que recobre a superfície do esporozoíto no estágio pré-eritrocítico (53). A RTS,S demonstrou uma eficácia entre 32% e 57% em adultos de áreas endêmicas e não endêmicas de malária (54–57). Entretanto, essa proteção foi de curta duração. Em grupos de crianças de 5 a 17 meses, foi observada uma proteção de até 45% em 20 meses, decaindo para 28% em 4 anos em comparação as crianças não imunizadas (58–60). Apesar da queda da eficácia ao longo do tempo, essa vacina ainda demonstra um claro benefício. Contudo, a Organização Mundial de Saúde preconiza uma eficácia de aproximadamente 75%, tornando importante a busca de novos candidatos vacinais mais eficazes.

Recentemente, um novo candidato vacinal vem se mostrando como a grande promessa na luta contra malária. A R21/MM é um candidato vacinal pré-eritrocítico que consiste no antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) fusionado com

a região C-terminal e central repetida da CSP. É a primeira vacina antimalárica a registrar eficácia de 77% na população-alvo de crianças africanas ao longo de 12 meses de acompanhamento (61). Atualmente, a fase II dos ensaios clínicos está em andamento afim de acompanhar a segunda temporada de malária após a dose de reforço ter sido aplicada. Essa etapa é crucial e permitirá a determinação da durabilidade da eficácia dessa vacina. A fase III do ensaio clínico já está planejada e será realizada em 5 países africanos que apresentam diferentes níveis de transmissão. Esse projeto está caminhando com o objetivo de licenciar uma vacina segura, de baixo custo e com alta eficácia (61)

O segundo alvo para candidatos vacinais é o estágio eritrocítico. Essa etapa do ciclo de vida começa com a ruptura dos hepatócitos e consequente liberação dos merozoítos na corrente sanguínea sendo a única etapa do ciclo responsável pelos sintomas da malária (39). O ponto chave da imunidade do estágio eritrocítico são os anticorpos que tem como alvo as formas sanguíneas do parasito, e como um certo nível de imunidade é adquirido após sucessivas infecções em área endêmicas (62), pode ser possível imitar e acelerar esse processo de imunidade naturalmente adquirida através de vacinas contendo proteínas presentes na superfície do merozoíto e envolvidas no processo de invasão ao eritrócito. Espera-se que uma vacina baseada em candidatos eritrocíticos seja capaz de eliminar ou significativamente reduzir a carga parasitária tendo impacto direto na morbidade e mortalidade da malária em áreas endêmicas através da indução de anticorpos que bloqueariam a ligação dos eritrócitos a células endoteliais, promovendo a opsonização e destruição de merozoítos e eritrócitos infectados por células fagocíticas (39,51,52).

Como exemplo de antígenos expressos na superfície do merozoíto que são utilizados como candidatos vacinais podemos citar o Antígeno de Ligação ao Eritrócito (EBA), Proteínas de Superfície do Merozoito 1, 2, 3, 4 e 5 (MSP), Proteína Rica em Serina (SERA), Antígeno de Superfície da Hemácia Fase de Anel (RESA), Proteína Rica em Glutamato (GLURP), Antígeno da Membrana Apical (AMA) -1, entre outros (35). Contudo, nenhum antígeno do estágio eritrocítico apresentou resultados satisfatórios em estudos de fase dois realizados em áreas endêmicas de malária. Dos antígenos citados acima, a formulação utilizando o antígeno AMA-1 demonstrou eficácia relevante em infecções clínicas da malária, e uma formulação que incluía três variantes de AMA-1 demonstrou alta imunogenicidade com a durabilidade de 2 anos em adultos expostos a malária (63,64)

Outra abordagem considerada como candidata é a vacina contra toxinas, as denominadas vacinas anti-doenças, visto que não agem sobre o desenvolvimento do parasito, somente nas manifestações clínicas. Uma vacina capaz de bloquear as toxinas liberadas pelos parasitos poderia minimizar ou até mesmo evitar os sintomas da malária, e conseqüentemente, os casos mais graves da doença. No entanto, esse tipo de vacina deve ser utilizado numa estratégia conjunta com uma vacina antiparasitária, pois o aumento da parasitemia, mesmo na ausência dos sintomas clínicos podem levar conseqüências graves ao indivíduo que contraia a infecção (65).

As vacinas bloqueadoras de transmissão têm como alvo as formas sexuais ou gametócitos. Essa modalidade tem como objetivo a interrupção da transmissão parasitária entre humanos e o inseto vetor através da indução de anticorpos contra antígenos presentes nos estágios sexuais do parasito (66). Os anticorpos seriam ingeridos pelo mosquito no momento do repasto sanguíneo e impediriam o desenvolvimento parasitário dentro do intestino da fêmea do *Anopheles* sp. prevenindo a fertilização e levando a falha na produção de esporozoítos culminando na redução do potencial de transmissão do mosquito para o próximo hospedeiro humano. Esse tipo vacina também é chamado de “vacina altruísta” ou “vacina solidária” pois não confere proteção diretamente para o indivíduo vacinado, mas sim na população receptora, no entanto a vacina precisaria ser aplicada em toda população para efetivamente bloquear a transmissão (52,67). Os candidatos vacinais para vacina bloqueadoras de transmissão incluem as proteínas pfs48/45, pfs230, pfs25 e psf28 (35).

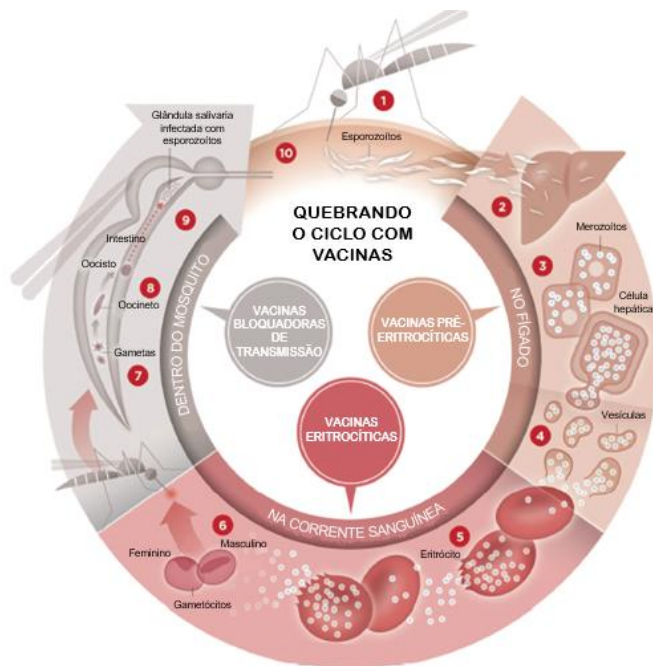


Figura 5 - Estágios-alvo para candidatos vacinais.
 Fonte: Adaptado de Laurens, 2018

A complexidade de desenvolver uma vacina antimalárica reside na dificuldade de encontrar um candidato vacinal ou a combinação de antígenos candidatos vacinais de vários estágios no ciclo que irão induzir uma resposta imune robusta e duradoura. A maioria dos antígenos candidatos estudados apesar de ser muito imunogênicos também é altamente polimórfico, bem como o que é altamente conservado tendem a ser menos imunogênicos ou a não induzir uma alta titulação de anticorpos (31,51). Felizmente nos últimos anos houve progresso significativo em identificar e caracterizar novos antígenos potencialmente candidatos a compor uma vacina antimalárica presentes em diversos estágios do ciclo de vida do parasito importantes no seu desenvolvimento e sobrevivência (tabela 1).

Tabela 1 - Principais antígenos plasmodiais candidatos a vacina antimalárica.

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

Fonte: Baptista, 2017 (68)

1.5 Proteínas da Superfície de Merozoítas (MSPs)

Uma das habilidades mais importantes do *Plasmodium* sp. é a sua capacidade de reconhecer e penetrar nos eritrócitos. O contato inicial entre o merozoíto e o eritrócito é um passo crucial pois o parasito deve distinguir entre os eritrócitos competentes para invasão e outros tipos de célula (69). Nesse contexto, alguns antígenos localizados na superfície do parasito tem sido caracterizados (68) levando a uma melhor compreensão do seu ciclo de vida e conseqüentemente culminando na identificação de possíveis alvos que possam ser explorados numa vacina antimalárica (70).

Os merozoítos, estágio extracelular do ciclo evolutivo do *P. falciparum* representam um importante alvo vacinal porque estão expostos ao sistema imune do hospedeiro antes da invasão no eritrócito e anticorpos contra vários antígenos de merozoítos estão associados com a imunidade protetora em humanos (70,71). A superfície do merozoíto é constituída principalmente por proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo a Proteína de Superfície do Merozoíto (MSP) -1 a mais abundante (72).

A MSP-1 é sintetizada no esquizonte intracelular como um precursor de aproximadamente 195 kDa. Ao final da esquizogonia, essa proteína passa por uma série de clivagens proteolíticas dando origem a polipeptídios de tamanhos variados. Alguns desses polipeptídios se associam a outras proteínas da superfície do merozoíto (MSP-7 e MSP-6) e formam um complexo não covalente que é transportado para a superfície (73).

Esse complexo consiste em 4 polipeptídios de MSP-1 clivados, que são nomeados de acordo com o seu peso molecular: um fragmento de 83 kDa (MSP-1₈₃), dois fragmentos de 30 e 38 kDa (MSP-1₃₀ e MSP-1₃₈) e um fragmento de 48 kDa (MSP-1₄₈). Após a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, ocorre um segundo processamento, no qual o polipeptídio de 48 kDa é clivado por uma segunda protease e resulta em dois fragmentos menores, um de 33 kDa (MSP-1₃₃) e outro de 19 kDa (MSP-1₁₉) (72). O fragmento MSP-1₃₃ é liberado na corrente sanguínea ao passo que o fragmento C-terminal MSP-1₁₉ é ancorado na membrana do merozoíto via GPI (74).

O papel da MSP-1 e das outras MSPs na invasão e crescimento do parasito no eritrócito ainda não foi bem esclarecido, entretanto acredita-se que ela apresenta papel na invasão do eritrócito, uma vez que o receptor do fragmento C-terminal MSP-

1₁₉ é a Banda 3, uma proteína abundantemente presente na membrana do eritrócito (75). Soma-se o fato de que o fragmento N-terminal da MSP-1₈₃ interage com a glicoforina A (GPA) em populações africanas e endêmicas no geral e com a glicoforina B (GPB) em populações amazônicas brasileiras (76,77), que também são abundante na superfície do eritrócito, sugerindo um modelo de invasão em que as múltiplas subunidades da MSP-1 se ligam ao complexo GPA – banda 3 na superfície da célula no momento inicial da invasão (78).

Adicionalmente, outras MSPs não apresentam ancoramento por GPI ou domínio transmembrana, provavelmente se associando extrinsecamente pela ligação direta com proteínas na superfície do parasito (Figura 6). Entre as proteínas que não possuem ancoramento por GPI ou domínio transmembrana estão membros da família MSP-3 (69).

A Proteína da Superfície do Merozoíto 3 (MSP-3) é uma proteína expressa principalmente no estágio esquizonte do parasito como um precursor de aproximadamente 62 kDa e então subseqüentemente processada em uma proteína madura de 44-48 kDa por meio da remoção da sua região N-terminal via vacúolo parasitóforo. Alguns dos fragmentos processados parecem se associar com a superfície do merozoíto contudo a maioria é liberada no sobrenadante da cultura no momento da ruptura do esquizonte (79).

Os membros da família MSP-3 são caracterizados por um domínio SPAM (Antígeno Polimórfico Secretado Associado com Merozoítos) na sua região C-terminal conservado entre os membros da família e em isolados de campo, resultando na indução de anticorpos com reatividade cruzada (80). Dois membros caracterizados na família da MSP-3 possuem uma particularidade que as diferenciam do resto das proteínas dessa família. Além do domínio C-terminal SPAM, elas também possuem uma região rica em cisteína denominada domínio DBL (Domínio de Ligação ao Duffy). Ligantes para a invasão do parasito nos eritrócitos, como a Proteína de Ligação ao Duffy de *P. vivax* e o Antígeno de Ligação ao Eritrócito-175 (EBA-175), EBA-140 e EBA-181 de *P. falciparum*, contém o domínio DBL que se ligam aos receptores na superfície dos eritrócitos e medeiam a invasão do merozoíto (81–83). Estudos mostraram que as MSPDBL-1 e MSPDBL-2 se ligam diretamente à MSP-1 na superfície do *P. falciparum*, formando um complexo que interage com um receptor ainda não identificado na superfície do eritrócito através de seu domínio DBL, facilitando a invasão do *P. falciparum* no eritrócito (72,84–87).

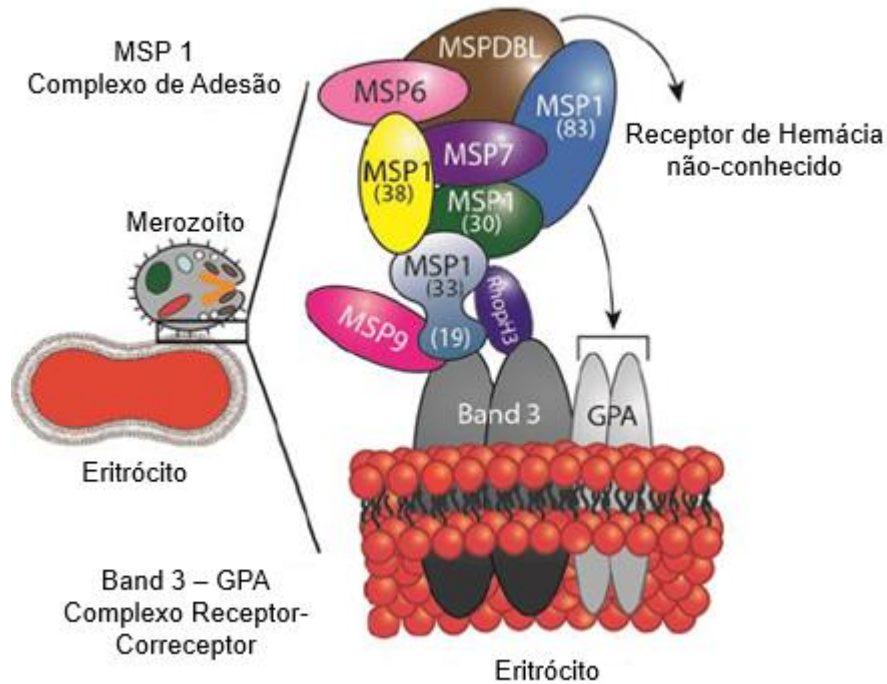


Figura 6 - Representação esquemática das proteínas envolvidas no processo de invasão do merozoíto no eritrócito.

Fonte: Adaptado de Baldwin, 2015

1.6 Proteína de Superfície do Merozoíto de ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 e MSPDBL-2)

As MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são proteínas exportadas no estágio de esquizonte, semelhante a outras proteínas do *P. falciparum* que estão envolvidas no processo de invasão do merozoíto (84). O seu gene está localizado no cromossomo 10 próximo de genes que codificam outras MSPs, como a MSP-3, MSP-6 e a GLURP. Estudos funcionais têm mostrado que as MSPDBL-1 e -2 têm atividade de ligação ao eritrócito quando expressa em células COS (Células CV-1 (símio) transformadas por mutante defeituoso de Origem de SV40) e que MSPDBL-2 está associada com a resistência ao antimalárico halofantrina (88). Essas proteínas contêm um domínio único central DBL e um domínio SPAM na região C-terminal, no entanto não possuem domínio transmembrana ou ancoramento por GPI (figura 7) (84,85).

Análises de população genômica revelaram um grande número de polimorfismos em ambos os genes, principalmente nos domínios DBL, consistente com o fato desses genes estarem sob forte seleção balanceadora, tipo de seleção que mantém diferentes alelos dentro de uma população, um indicativo de que essas

proteínas estejam sofrendo intensa pressão imunológica, concordante com a sua presença na superfície do merozoíto (89). A seleção balanceadora age quando há pressão seletiva em um determinado loci, operando de forma que o valor adaptativo de um alelo seja inversamente proporcional a sua frequência, resultando na manutenção de alelos polimórficos na população, assim como a maior persistência da diversidade alélica em relação a variação neutra (90). As MSPDBL-1 e MSPDBL-2, por serem proteínas da superfície do merozoíto, estão mais expostas ao sistema imune do hospedeiro, logo, a seleção balanceadora atuaria mantendo a diversidade genética vantajosa e assim facilitando a evasão do parasito do sistema imunológico do hospedeiro.

O domínio SPAM é caracterizado por ter uma região C-terminal rica em ácido glutâmico seguido de uma região com sequência de leucina zíper-like (LLZ). Os motivos LLZ são motivos comumente encontrados em proteína de ligação ao DNA, o zíper de leucina é uma hélice anfipática contento repetições de resíduos de leucina e funciona como um módulo de dimerização e são importantes para interações proteína-proteína, visto que levam a oligomerização destas (91). O motivo LLZ é fundamental para a oligomerização das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2, visto que quando há truncamento da região LLZ nessas proteínas, não há interação entre elas e a MSP1. A deleção do motivo LLZ do domínio SPAM é suficiente para prevenir a ligação desse fragmento ao eritrócito (72). Em todos os membros da família MSP-3 e nas MSPDBLs também é possível observar o motivo conservado NLR(K/N)(A/G/N) perto da região N-terminal, no entanto, a significância desse motivo ainda não foi elucidada (84). As MSPDBL-1 e a MSPDBL-2 possuem o domínio SPAM muito semelhante a MSP-6 e, por essa região C-terminal ser altamente conservada entre os membros da família, ela pode ser uma opção para induzir resposta imune de reatividade cruzada, que podem ter como alvo vários membros da família MSP-3 (72).

O domínio DBL dessas proteínas é altamente polimórfico, sugerindo que essas proteínas estão sobre grande pressão seletiva provavelmente do sistema imune do hospedeiro, visto que são proteínas de superfície (89,92,93). Apesar dos polimorfismos, o domínio DBL das MSPDBLs, que contêm oito cisteínas e uma sequência de motivo "WWXXXXXXXXW", apresenta estrutura geral semelhante ao domínio DBL dos membros da família EBL e EBA, como por exemplo a EBA-175. Ao alinhar a sequência de aminoácidos dos domínios DBL de proteínas membros da família EBL e da MSPDBL é possível perceber que seis das cisteínas são conservadas com as do gene *Var* e o domínio F2 de proteínas da família EBA (84).

Algumas das proteínas que possuem o domínio DBL, como a EBA- 175, EBA-140 e EBA-181 se localizam nos micronemas, que fazem parte do complexo de organelas secretórias da porção apical do parasito. Essas proteínas se ligam ao eritrócito do hospedeiro de uma maneira ácido siálico-dependente e estão intrinsecamente envolvidas no processo de invasão do eritrócito (69). No entanto a MSPDBL-1 não foi encontrada na porção apical do merozoíto, sugerindo que ela não está presente no micronema como as proteínas supracitadas. Aparentemente, a MSPDBL se encontra associada exclusivamente na superfície do merozoíto, assim como outras proteínas que contém o domínio SPAM. Outras MSPs como a MSP-1, -2, -4 e -5 se ligam à membrana plasmática através do seus domínios transmembrana ou ancoras GPI, porém a MSPDBL não apresenta quaisquer dessas características, sendo então identificadas como proteínas periféricas, ou seja elas permanecem na superfície do merozoíto através de interações com outras proteínas integrais de membranas (84).

Pesquisas têm mostrado que as proteínas de ligação ao eritrócito MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão associadas com a MSP-1 na superfície do parasito formando assim um complexo que age como uma plataforma para as MSPDBL-1 e MSPDBL-2 se ligarem ao seu receptor na superfície do eritrócito. A ligação das MSPDBL-1 e MSPDBL-2 com a MSP-1 pode ocorrer tanto pelo domínio SPAM quanto pelo seu domínio DBL e essa ligação é dependente de uma conformação estabilizada por pelo menos três ligações dissulfeto conservadas. Ambas as proteínas interagem com as subunidades p42, p38 e p83 da MSP-1 sugerindo a presença de múltiplos sítios de ligação que contribuem para a afinidade de ligação e para a estabilidade do complexo (72,85).

Ainda não está claro se as duas proteínas apresentam a mesma função, no entanto algumas evidências indicam que sim. As duas têm os mesmos domínios estruturais e se ligam à MSP-1 através das mesmas subunidades, ambas se ligam a um receptor específico ainda não identificado no eritrócito (84,85) e ainda não foi possível interromper os dois genes na mesma linhagem parasitária, sugerindo que eles possam ter uma função redundante (69).

Embora essas proteínas apresentem o perfil polimórfico, estudos realizados em áreas de alta endemicidade de malária mostraram que anticorpos contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão associados com proteção contra a malária clínica (86,94) e são capazes de inibir o crescimento do *P. falciparum in vitro*, sugerindo um importante papel na imunidade antimalárica (80,86,95). Estudos prévios conduzidos

em nosso laboratório mostraram que MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são amplamente reconhecidas por anticorpos de indivíduos residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária, demonstrando que são imunogênicos na infecção natural por *P. falciparum*. Entretanto, cerca de 40% da população estudada não apresentavam anticorpos que reconheçam a MSPDBL-1 e/ou a MSPDBL-2, podendo essa não resposta imune estar associado a fatores do hospedeiro, como por exemplo o fator genético (HLA) (96) . Nossa hipótese é que a presença de polimorfismos nas regiões gênicas que codificam as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 podem modular as respostas imune celular e humoral específicas.

A identificação de polimorfismos genéticos e o impacto dos polimorfismos identificados nas regiões potencialmente antigênicas de MSPDBL-1 e MSPDBL-2 podem gerar dados que ressaltem o potencial dessas proteínas como candidatas a vacina antimalárica que possam, no futuro, serem testadas na população de regiões endêmicas residentes na Amazônia brasileira.

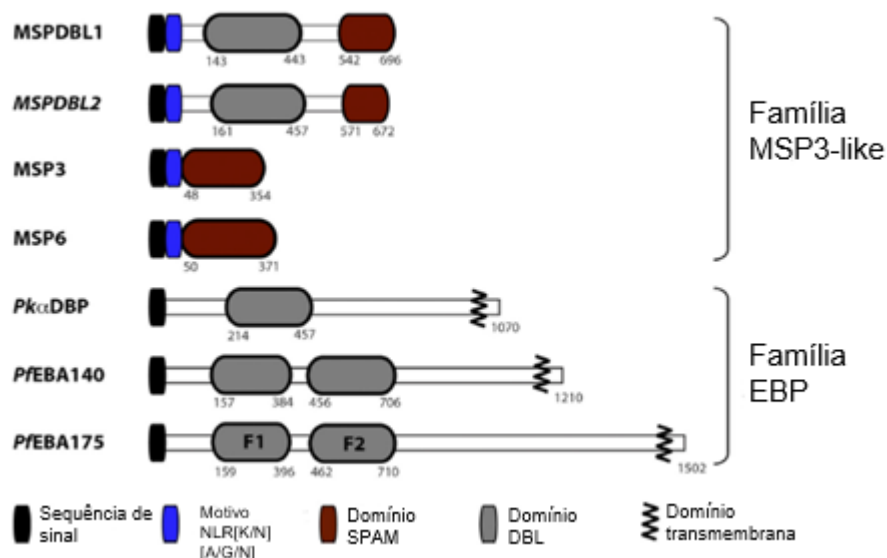


Figura 7 - Estrutura das proteínas MSPDBL-1 e 2, MSP-3 e EBL.
 Fonte: Adaptado de Hodder et al., 2014.

1.7 Resposta imune associada ao HLA

Considerando a complexidade ciclo biológico do *Plasmodium*, diferentes mecanismos imunes são ativados, dependendo do estágio que o parasito se encontra e da sua localização, se dentro ou fora da célula hospedeira. A resposta imune do hospedeiro também depende de diversos fatores, como por exemplo o fator genético

ligado ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (97). O Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex; MHC) também referido como Antígeno Leucocitário Humano (Human Leukocyte Antigen; HLA), é uma região extremamente polimórfica no cromossomo 6 que codifica as principais moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos, pequenos peptídeos derivados de patógenos, na superfície celular (96,98). Essa região compreende mais de 200 genes e pseudogenes divididos em 3 subgrupos: HLA de classe 1 o qual inclui genes clássicos e altamente polimórficos HLA-A, HLA-B e HLA-C, bem como os genes não clássicos e que exibem limitado polimorfismo como os HLA-E, HLA-F e HLA-G. A região da classe 2 inclui os genes HLA-DR, -DQ, -DP, -DM, e -DO, menos variáveis envolvidos no processamento e apresentação de antígenos e são expressos nas células apresentadoras de antígenos (APCs) como macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans e células Kupffer. As proteínas produzidas pelos genes de HLA de classe 3 estão implicadas na resposta inflamatória, maturação leucocitária e na cascata do sistema complemento (96).

A variação genética do HLA foi relacionada a doenças primeiramente com o linfoma de Hodgkin (99) e o HLA-B e, desde então, uma miríade de doenças foram associadas com o HLA. Os polimorfismos no HLA são úteis na busca por doadores compatíveis, no rastreamento da migração populacional e na sua relação potencial com a seleção mediada por patógenos (97). A diversidade genética encontrada nas moléculas de HLA em nível populacional podem maximizar as chances de pelo menos alguns indivíduos conseguirem montar uma resposta imune eficiente contra algum infecção emergente e sobreviver. Mecanismos como conversão genética e mutações pontuais geraram essa diversidade genética (98). Muitos dos polimorfismos observados em genes do MHC levam a mudanças de aminoácido não sinônimas nas fendas de ligação dos peptídeos com as moléculas de HLA, ressaltando a importância da ligação peptídeo-HLA e demonstrando forte pressão de seleção nessa fenda (96).

Diversos trabalhos demonstraram associações entre HLA e mecanismos de proteção, resposta imune e susceptibilidade à malária. Podemos citar como exemplo o HLA-B*53 e DRB1*1302-DQB1*0501, identificado em um estudo na Gambia, em que indivíduos que carregam esse tipo de HLA estavam protegidos contra a malária severa (100). Outros alelos de HLA também estão envolvidos na susceptibilidade (A*30:01, A*33:01, DPB1*17:01 e DRB1*04:01) ou resistência (B*53:01, DQB1*05:01, DRB1*01:01 e DRB1*13:02) à malária, baseados na sua frequência nas populações (revisado em 101). Assim, as moléculas de HLA tem sido utilizadas como marcadores

genéticos na possível modulação no sistema imunológico durante a infecção malárica, principalmente considerando o contexto de utilização de vacinas de subunidades e candidatos vacinais para malária (97).

1.8 Justificativa

Apesar da interação entre os humanos e os plasmódios ser antiga e de longa data, ainda há lacunas no conhecimento de estratégias de controle a fim de mitigar os casos e as mortes por malária no mundo. Assim, essa doença permanece como a mais prevalente nos países tropicais e subtropicais, causando elevados números de casos (7). Novas estratégias de controle dessa doença são necessárias e, dentre elas, o desenvolvimento de uma vacina eficaz representa a melhor arma de combate contra esse parasito.

Nosso Laboratório tem avaliado o perfil da resposta imune contra antígenos de *P. falciparum* em populações da Amazônia brasileira visando identificar o potencial antigênico e imunogênico de moléculas que possam fornecer informações que contribuam para o delineamento de estratégias vacinais (102–104). As proteínas MSPBDL-1 e MSPDBL-2 estão presentes na superfície dos merozoítos e participam do processo de invasão no eritrócito. Estudos realizados em áreas de alta endemicidade de malária mostraram que anticorpos naturalmente adquiridos contra as MSPDBLs são capazes de inibir o crescimento do *P. falciparum in vitro*, indicando que a resposta imune contra MSPDBL-1 e MSPDBL-2 pode participar do processo de imunidade antimalárica (86,94). Além disso, estudos prévios conduzidos em nosso Laboratório mostraram que MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são amplamente reconhecidas por anticorpos de indivíduos residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária. Entretanto, cerca de 40% da população estudada não apresentavam anticorpos que reconheciam a MSPDBL-1 e/ou a MSPDBL-2 (dados não publicados). Considerando que a extensiva diversidade genética exibida pelo *P. falciparum* é um fator importante para a evasão do parasito ao sistema imune dos hospedeiros (41), acreditamos que a presença de polimorfismos nas regiões genéticas que codificam as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 podem modular as respostas imune celular e humoral específicas. Assim, nos propomos a identificar polimorfismos genéticos e avaliar o impacto desses polimorfismos nas regiões potencialmente antigênicas das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em isolados de *P. falciparum* que circulam em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira. Considerando que os parasitos que

circulam no Brasil e as populações expostas podem apresentar características genéticas diferentes de outras áreas endêmicas, torna-se importante a realização de estudos que possam contribuir para um melhor entendimento da resposta imune naturalmente adquirida para os antígenos candidatos a compor uma vacina antimalária, visto que a eficácia de uma vacina pode variar em diferentes cenários epidemiológicos. Os dados gerados podem ressaltar o potencial das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 como candidatas a vacina antimalária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar polimorfismos nas regiões gênicas que codificam as proteínas MSPDBL-1 E MSPDBL-2 em isolados de *P. falciparum* que circulam em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar polimorfismos genéticos nos domínios DBL e SPAM das proteínas MSPDBL-1 E MSPDBL-2 em isolados de *P. falciparum* que circulam em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira.
- Avaliar o impacto desses polimorfismos nas regiões potencialmente antigênicas das proteínas MSPDBL-1 E MSPDBL-2

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A região Amazônica concentra 99,9% dos casos de malária no Brasil, sendo considerada área endêmica para a doença. Neste contexto, o estudo foi realizado nos municípios de Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima, no estado do Acre, e Guajará, no estado do Amazonas (figura 8). Esses municípios estão caracterizados entre os 10 que concentram 70% de malária por *P. falciparum* no país (4^a, 1^a, 9^a respectivamente) (13) e serão alvos prioritários de ações do ministério da saúde (MS) que priorizam a eliminação do *P. falciparum* no Brasil.

Para referência, o IPA é a medida do risco de contrair a doença numa região. Esse risco é correspondente a quantidade de lâminas positivas dividido pela população em risco e multiplicado por 1.000. As áreas endêmicas são classificadas de acordo com o IPA em alto risco (IPA ≥ 50), médio risco (IPA 10 a 49) e baixo risco de transmissão (IPA 0,1 a 9) (105).

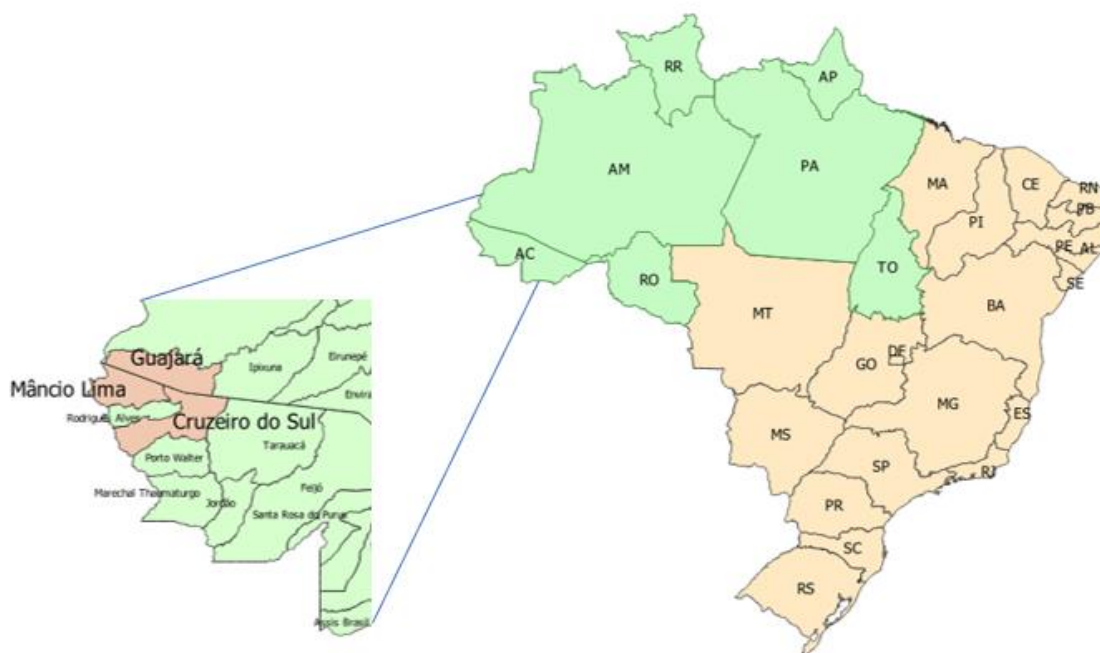


Figura 8 - Mapa geográfico com a localização das áreas de estudo. A localização das cidades de Guajará (AM), Mâncio Lima (AC) e Cruzeiro do Sul (AC) estão destacadas em rosa. Fonte: elaborado pela autora.

Cruzeiro do Sul (07°37'51" S e 72°40'12" W), localizado a 648 km da capital Rio Branco, é o segundo município mais populoso do Acre com 89.072 habitantes de

acordo com estimativas de 2020 do IBGE. Situado às margens do rio Juruá, no noroeste do estado, esta cidade é considerada o mais importante polo turístico e econômico do interior, possuindo área territorial de 8.779,407 km². Nos anos de 2016 e 2018 em que foram realizadas as coletas, Cruzeiro do sul registrou, respectivamente, 16.721 e 12.931 casos de malária e índice parasitário anual (IPA) de 231,9 e 147,5/ 1000 habitantes. Cruzeiro do Sul se encontra a 35,3 km de Mâncio Lima.

Mâncio Lima (7°36'51" S e 72°53'45" W), situado no interior do estado do Acre, no vale do Juruá, é conhecido por ser o município mais ocidental do Brasil. Possui área territorial de 5.453,034 km² e população estimada de 19.311 habitantes segundo o IBGE (2020). Em 2016, a cidade contabilizou 6.372 casos de malária e apresentou o IPA extremamente alto de 436,4/1000 habitantes, caracterizando essa área como hiperendêmica para a doença. Em 2018, ano da segunda coleta, nota-se que número permaneceu alto com 8.303 casos e IPA de 422,8/1000 habitantes. Mâncio Lima se encontra a 48,5 km de Guajará.

A cidade de Guajará (2°58'19" S e 57°40'39" W) localizado a 1.487 km de Manaus, capital do Amazonas. Possui população estimada de 16.937 habitantes (IBGE, 2020) e área territorial de 8.904 km², situando-se na margem esquerda do rio Juruá. No ano da primeira coleta (2016), o município apresentou 2.064 casos, com o IPA de 128,3/1000 habitante. No momento da segunda coleta (2018) o número de casos diminuiu para 2.043 e o IPA 124,5/1000. Guajará se encontra a 21,2 km de distância de Cruzeiro do Sul.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários

3.2.1 Critérios de inclusão

Todos os indivíduos residentes nas localidades acima descritas que aceitaram participar do nosso estudo, com diagnóstico positivo para malária por *P. falciparum*.

3.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do nosso estudo populações indígenas, grupos religiosos, militares, presidiários, doentes mentais, parturientes e gestantes, crianças abaixo de 12 anos de idade, indivíduos com infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*).

3.3 Aspectos éticos

Esse projeto e o seu termo de consentimento foram aprovados pelo comitê de ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248;221/03) (anexo I).

3.4 Coleta de dados pessoais e epidemiológicos

As coletas foram realizadas através de busca ativa (visitas domiciliares) e busca passiva (postos de notificação). Durante as visitas os indivíduos foram informados sobre as formas de transmissão de malária e medidas profiláticas. O projeto foi explicado para os indivíduos, ressaltando que a participação deles era de livre e espontânea vontade e que a recusa em participar não acarretaria qualquer prejuízo ao atendimento e/ou tratamento deles. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo leram ou foram informados do conteúdo do termo de consentimento. Após o consentimento dos indivíduos, foi obtida uma autorização por escrito de todos os voluntários (anexo II) ou dos seus responsáveis (anexo III). Após a assinatura, todos os voluntários participaram de uma entrevista com o objetivo de preencher um questionário de investigação para a coleta de dados pessoais e epidemiológicos (anexo IV)

3.5 Coleta e processamento das amostras de sangue

Após o consentimento, um volume de 5 mL de sangue foi obtido por punção na veia do antebraço utilizando-se tubos vacutainer com EDTA (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA). A coleta de sangue foi realizada por um biólogo, médico, farmacêutico ou técnico da equipe de investigadores. Todos os cuidados apropriados foram tomados, como o uso de seringa, gaze e agulha descartáveis, bem como álcool para antisepsia local, entre outros. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Microbiologia, Campus Floresta da Universidade Federal do Acre (UFAC), em Cruzeiro do Sul. As papas de hemácias foram criopreservadas em solução glicerolyte 1:1 (0.9% NaCl, 4.2% sorbitol, 20% glicerol, Sigma) e armazenadas em freezer -70 °C até o momento do uso.

3.6 Diagnóstico

3.6.1 Diagnóstico parasitológico

Na ocasião da coleta foram confeccionadas lâminas de distensão sanguínea e gota espessa coradas com o método de Mary-Grunwald Giemsa para identificação e quantificação dos parasitos circulantes por microscopia. A parasitemia foi expressa como o número de parasitos/ μ L de sangue, calculado multiplicando o número de parasitos contados por 500 leucócitos e o número de leucócitos do indivíduo dividindo o produto por 500. Doadores positivos para *P. vivax* e/ou *P. falciparum* no momento da coleta de sangue foram subsequentemente tratados pelo regime quimioterápico recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (106).

3.6.2 Diagnóstico molecular

Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico foram realizadas análises moleculares pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando iniciadores específicos para gênero (*Plasmodium* sp.) e espécies (*P. falciparum* e *P. vivax*) em todas as amostras, conforme descrito previamente por Snounou *et al.*, 1999 (107).

3.7 Extração de DNA

O DNA foi extraído das amostras de sangue criopreservadas utilizando o kit comercial QIAmp® DNA Blood Mini (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 200 μ L de sangue previamente descongelado em temperatura ambiente foram adicionados a um tubo eppendorf de 1.5 mL com 20 μ L de protease K (QIAGEN) no fundo e levemente homogeneizado. Em seguida foram adicionados 200 μ L do tampão AL (QIAGEN). O tubo foi homogeneizado rapidamente em vórtex e incubado a 56 °C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados 200 μ L de etanol 96-100%, o tubo foi novamente homogeneizado por 15 segundos, e em seguida adicionado no tubo com a coluna. A coluna inserida no tubo foi centrifugada por 3 minutos a 8.000 rpm e a coluna foi removida para um novo tubo desprezando o líquido. Em seguida, foram adicionados 500 μ L do tampão AW1 (QIAGEN) seguido de centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm e remoção da coluna para um novo tubo. Então, foram adicionados 500 μ L do tampão de lavagem AW2 (QIAGEN)

e o tubo foi centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm. Por fim, a coluna foi removida para outro tubo, onde o DNA foi eluído em 100 µL do tampão AE (QIAGEN) e estocado a 4 °C até a sua utilização.

3.8 Desenho dos iniciadores específicos para MSPDBL-1 e MSPDBL-2

Para se obter iniciadores específicos para a amplificação das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foi utilizada a sequência referência de *P. falciparum* 3D7 (clone do isolado NF54) depositada no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com os números de acesso pf3d7_1035700 e pf3d7_1036300 respectivamente. Todos os oligonucleotídeos foram verificados quanto a especificidade através da ferramenta Prime-BLAST fornecido pelo NCBI através do site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Posteriormente, os pares de iniciadores específicos foram sintetizados quimicamente para a realização da PCR e sequenciamento.

3.9 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A amplificação dos segmentos gênicos que codificam a MSPDBL-1 e a MSPDBL-2 foi realizada pelo método de PCR convencional utilizando iniciadores específicos (GenOne Biotechnologies, Rio de Janeiro, Brasil) para cada uma das proteínas e para os seus respectivos domínios DBL e SPAM (tabela 2).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na amplificação dos genes MSPSBL1 e MSPDBL2

Gene MSPDBL1	Iniciador	Sequência dos iniciadores
Domínio DBL*	Senso (F)	5'- TGCTTTTGGTGGTGGACTCCCT -3'
	Antissenso (R)	5'- GCACAACAGTTGCACGGTGTGAA -3'
Domínio SPAM*	Senso (F)	5'- CAAGGAAATTCACACCGTGC -3'
	Antissenso (R)	5'- AAATCTGTCATATCTTCTGTCAAAC -3'
Gene MSPDBL2		
Domínio DBL*	Senso (F)	5'- TCTACATGTTTTGTTGTAAATGA -3'
	Antissenso (R)	5'- CTATTCAAGGTAGAATCAC -3'
Domínio SPAM*	Senso (F)	5'- AGCGTGAGCGAAGAATCACA -3'
	Antissenso (R)	5'- TCAAGGTAGAATCACTTCCATTACC -3'

Fonte: *A autora, 2020;

Para a reação de PCR foram utilizados 2 µL do DNA extraído do isolados plasmodiais acrescidos a 23 µL do mix de PCR, contendo 2,5 µL de DNTPs a 10 nM, 1 µL de cada iniciador (senso e antissenso) a 10 pMol/µL, 2,5 µL de tampão 10x (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), 3 µL de MgCl₂ a 3 mM e 0,25 µL de AmpliTaq Gold™ DNA Polimerase (Applied Biosystem) 12,75 µL de água destilada ultrapura (Invitrogen) totalizando o volume final de 25 µL por reação. As reações de PCR foram submetidas a ciclagem de temperatura específicas para cada par de primer no termociclador ProFlex PCR System® (Applied Biosystems) e Veriti 96 Well Cycler (Applied Biosystem), nas condições descritas na tabela 3. Em todas as reações foram utilizados um controle negativo sem DNA, um controle com DNA extraído de isolado de *P. vivax* e um controle positivo (DNA extraído a partir de cultura *in vitro* de *P. falciparum*, cepa W2).

Tabela 3 – Condições de ciclagem para a amplificação

		35 ciclos			
DBL1F/DBL21R	94°C - 10'	95°C - 01'	68°C - 01'	72°C - 2'	72°C - 05'
SPAM1F/SPAM1R	94°C - 10'	95°C - 01'	62°C - 01'	72°C - 2'	72°C - 05'
DDBL2F/DBL2R	94°C - 10'	95°C - 01'	67°C - 01'	72°C - 2'	72°C - 05'
SPAM2F/SPAM2	94°C - 10'	95°C - 01'	58°C - 01'	72°C - 2'	72°C - 05'

Ao final da reação, 5 μL dos produtos da PCR previamente homogeneizados a 1 μL de 6X Loading Dye (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-acetato 0,04, EDTA 1 mM) contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídeo ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$, Sigma, St. Louis, MO), por aproximadamente 60 minutos a corrente elétrica constante de 90V/cm. Para estimar o dimensionamento dos fragmentos no gel foi utilizado um padrão de peso molecular de 100 pb (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, U.S.A.). Após a eletroforese, os fragmentos foram visualizados através do transiluminador High Performance UV transilluminator (UVP).

3.10 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados através do kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison Wisconsin, EUA), de acordo com os procedimentos especificados pelo fabricante. A purificação tem como objetivo a remoção de oligonucleotídeos não incorporados na PCR e que podem interferir na reação de sequenciamento. Após a purificação foi realizada a quantificação do DNA, utilizando o fluorômetro Qubit (Invitrogen). Para determinação das sequências exatas dos nucleotídeos, todas as amostras amplificadas foram então submetidas a reação de sequenciamento proposto por Sanger et al. (1977) utilizando o kit de sequenciamento *Big Dye Terminator Cycle Ready Reaction* versão 3.1 (Applied Biosystems) em condições previamente padronizadas pela Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/Fiocruz).

De acordo com o protocolo de sequenciamento, 5 μL de DNA na concentração de aproximadamente 20 ng/ μL e 2,5 μL de cada um dos mesmos iniciadores utilizados na reação de PCR a 3,2 pMol/ μL foram adicionados em cada um dos 96 poços da placa de sequenciamento (Applied Biosystems), totalizando o volume final de 7,5 μL por poço. A mistura para a reação de sequenciamento de DNA é realizada de acordo com o número de amostras. A quantidade necessária para uma placa inteira é de 100 μL de BigDye (Applied Biosystems) e 150 μL de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems). Um volume de 2,5 μL da mistura para a reação de sequenciamento foi adicionado em cada poço da placa (1 μL de BigDye + 1,5 μL de tampão 5x) e a placa foi coberta com uma tampa de borracha e levemente centrifugada (spin). No termociclador, foi utilizado o seguinte protocolo: 40 repetições do ciclo que consiste em alternância de 94 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos

e 60 °C por 4 minutos. Após a ciclagem da reação de sequenciamento, os produtos passaram por um processo de precipitação para a retirada de ddNTPs livres que podem interferir na leitura da sequência de DNA no sequenciador. Esse processo consistiu e em centrifugar brevemente a placa (spin), adicionar 30 µL de isopropanol 75% (MERCK, Darmstadt, Alemanha) em cada poço, homogeneizar as amostras em vórtex por 10 segundos e incubar por 15 minutos ao abrigo da luz. A placa foi então centrifugada por 45 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante foi descartado utilizando movimentos circulares sobre o papel toalha. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de Etanol 75% (MERCK) em cada poço da placa que foi, então, centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm para remoção do sobrenadante, como descrito anteriormente. Em seguida a placa foi centrifugada invertida (*spin down*) utilizando papel toalha para a absorção do etanol e, quando a centrifuga chegou a 600 rpm, o processo foi interrompido. Ao final, a placa foi colocada no termociclador a 60 °C por 10 minutos e em seguida armazenada a -20 °C até o momento da sua leitura no sequenciador.

Para a leitura da placa no sequenciador foram adicionados 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) em cada poço da placa seca que foi, posteriormente, centrifugada brevemente, colocada no termociclador a 95 °C por 3 minutos e colocada imediatamente no gelo por 5 a 10 minutos. Por fim, a placa foi centrifugada brevemente para os produtos aderidos as paredes dos poços concentrarem-se no fundo. A placa foi, então, conduzida para a leitura na plataforma de sequenciamento por capilar automático de DNA ABI Prism DNA Analyzer 3730xl (Applied BioSystems) da Plataforma de Sequenciamento de Instituto Oswaldo Cruz (PDTIS/Fiocruz).

3.11 Análise dos polimorfismos

As sequências nucleotídicas obtidas (senso e antissenso) de cada amostra foram analisadas utilizando os programas provenientes do pacote DNASTAR/Lasergene Software (Madison, WI). O programa BLAST (Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas) foi utilizado para verificar a similaridade e identificar os polimorfismos em relação a sequência referência 3D7 depositada no NCBI. O alinhamento da sequência consenso com a sequência referência foi realizado pelo programa MegAlign 7.0.0 (DNASTAR/Lasergene Software) utilizando o algoritmo do programa Clustal X2 e Clustal Ômega sendo feito um ajuste manual através do programa EditSeq 7.0.0 (DNASTAR/Lasergene Software). A fim de estimar a diversidade

genética intrapopulacional, as sequências gênicas de *mSPDBL-1* e *mSPDBL-2*, domínios DBL e SPAM, foram analisadas utilizando o software DnaSP v6 (108) com base nos parâmetros de número de sítios segregantes (S), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (k), número de haplótipos (h) e diversidade haplotípica (Hd). Para testar a teoria neutra da evolução, os valores D de Tajima foram calculados utilizando o número total de mutações também estimadas com o software DnaSP v6. O teste Tajima informa sobre as forças de seleção e demográficas que atuam sobre uma população. Valores positivos podem ser sugestivos de seleção positiva ou balanceadora. Essa força mantém os alelos em frequências equilibradas. Por outro lado, valores negativos sugerem seleção purificadora ou expansão populacional recente (109).

3.12 Modelagem 3D das MSPDBL-1 e MSPDBL-2

A estrutura 3D das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram preditas utilizando o servidor *Robetta* (110) em colaboração com o Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva do laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais/ Fiocruz. O servidor *Robetta* permite a modelagem de estruturas 3D de proteínas através de abordagens *ab initio* e por comparação. Esse servidor é continuamente avaliado pelo CAMEO (Modelo de Avaliação Automatizada Continuada) e estabelece critérios de avaliação de qualidade de previsão da estrutura proteica (110,111). A qualidade das estruturas proteicas geradas foi analisada pelo sistema MolProbity, amplamente utilizado para validação de proteínas e ácidos nucleicos, afim de escolher o melhor modelo preditivo das proteínas de interesse (112).

3.13 Predição *in silico* de epítomos de células B e células T

A predição dos epítomos lineares de células B foi realizada em colaboração com o Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva, utilizando o software BCPreds (113). Essa predição é baseada usando modelos de vetores de suporte de máquinas. Uma classe de método de aprendizagem de máquinas supervisionadas utilizadas para classificação e regressão. Foi realizada a seleção de busca por epítomos com o comprimento de 15 aminoácidos e todos acima do limiar padrão estabelecido pelo programa (75%) foram considerados.

A ligação diferencial de epítomos de células T das sequências completas das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram analisadas utilizando o IEBD (Banco de dados de Epítomos Imunes e Recurso de Análises), como ferramenta de análise que utiliza os algoritmos ANN aka NetMHC (114,115), para calcular a afinidade de ligação de peptídeos a diferentes alelos de HLAs por meio de redes neurais artificiais e matrizes de pontuação, SMM (116) utilizado para calcular matrizes a partir de dados de afinidade quantitativos de peptídeos que se ligam a moléculas de MHC e Comblib (117), conjunto de preditores que foram derivados de medições de afinidade de ligação de bibliotecas de peptídeos combinatórios contra um painel de alelos de MHC. Considerando o comprimento de 15 aminoácidos, a pontuação de predição de cada comprimento foi avaliada contra 26 dos alelos HLA mais frequentes. (HLA-A*01:01; HLA-A*02:01; HLA-A*11:01; HLA-A*23:01; HLA-A*25:01; HLA-A*26:01; HLA-A*30:01; HLA-A*31:01; HLA-A*32:01; HLA-A*68:01; HLA-B*08:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*35:01; HLA-B*38:01; HLA-B*39:01; HLA-B*40:01; HLA-B*46:01; HLA-B*48:01; HLA-B*51:01; HLA-B*53:01; HLA-B*57:01; HLA-B*58:01; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*07:01). Os comprimentos que têm uma pontuação média consenso inferior a 20 e, pelo menos, 60% da frequência de ligação a HLA foram considerados epítomos potenciais de células T.

3.14 Análise dos dados epidemiológicos

Os dados epidemiológicos e os resultados dos experimentos foram armazenados em banco de dados e analisados através de programas Epi-Info 6 (Centers for Disease Control and Prevention) e GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc). O teste do qui-quadrado foi utilizado para a avaliação das frequências dos SNPs entre os grupos estudados.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição da população estudada

No período estudado, anos de 2016 e 2018, o total de 65 isolados de *Plasmodium falciparum* foram coletados de pacientes residentes em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará. A população estudada consistiu em 36 (55,38%) indivíduos do sexo masculino e 26 (40%) do sexo feminino, com idades variando entre 12 e 73 anos (32 ± 16). A maioria dos indivíduos (93,8%) era proveniente da região Amazônica e estava residindo em área endêmica, em média, há 31 anos (31 ± 16). Os indivíduos relataram uma média de 13 episódios prévios de malária (13 ± 16), sendo o último episódio de malária 26 meses antes da coleta de sangue (26 ± 56). No momento da coleta 39 (60%) indivíduos apresentavam sintomas iniciados, em média, 4 dias antes da coleta (4 ± 5), sendo, cefaleia, febre e calafrio os mais frequentes, relatados por 89%, 84% e 53% dos indivíduos, respectivamente. As coletas foram realizadas nos meses de junho a agosto de 2016 e junho a julho de 2018, após o período de pico de transmissão.

4.2 Caracterização molecular das MSPDBL-1 e 2

4.2.1 Amplificação dos genes das MSPDBL-1 e MSPDBL-2 por PCR

Para avaliar o polimorfismo das regiões gênicas que codificam as proteínas MSPDBL-1 (*pfmspdbl1*) e MSPDBL-2 (*pfmspdbl2*) foram utilizados 65 isolados coletados de indivíduos residentes de Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima (Acre) e Guajará (Amazonas), com diagnóstico positivo por exame microscópico e/ou molecular confirmado para infecção por *P. falciparum*. Os iniciadores foram desenhados a partir do programa Primer-BLAST e as análises foram direcionadas para os domínios SPAM e DBL.

Nosso estudo foi iniciado investigando os polimorfismos do domínio SPAM do gene *pfmspdbl1* e do total de isolados estudado, 45 foram amplificados com sucesso por PCR, como observado por análise em gel de agarose (Figura 9). É possível observar em cada isolado amplificado a presença de um único fragmento com o tamanho aproximado de 600 pares de base (pb).

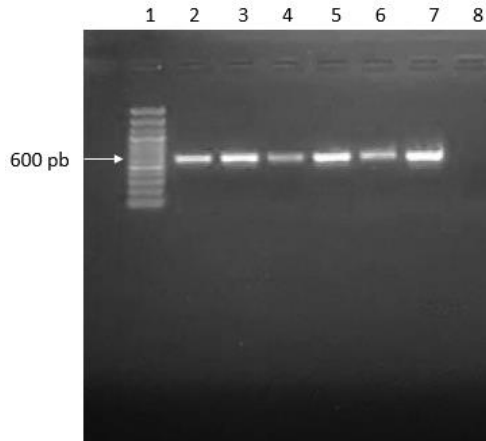


Figura 9 - Amplificação por PCR do domínio SPAM do gene *pfmspdbl1*. Gel de agarose mostrando o tamanho do fragmento dos produtos de PCR. Linha 1: marcador molecular de 100 pb. Linhas 2 a 6: amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* de CZS, ML e GJ. Linha 7: controle positivo da reação de PCR (amostra de cultura *in vitro* de *P. falciparum*). Linha 8: controle negativo.

Quanto ao domínio DBL da MSPDBL-1, 43 amostras foram amplificadas por PCR (figura 10). É possível observar em cada isolado amplificado a presença de um único fragmento com tamanho entre 1.000 e 1.100 pares de base.

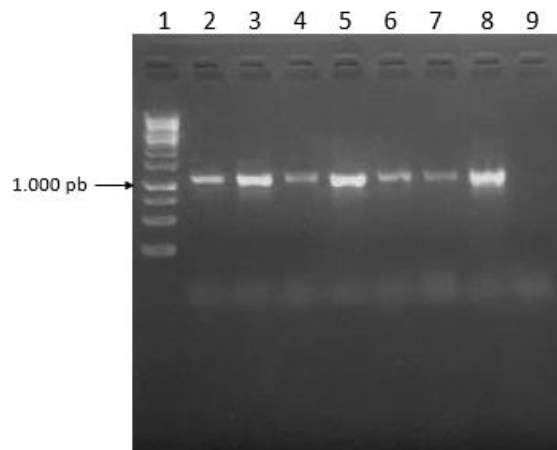


Figura 10 - Amplificação por PCR do domínio DBL do gene *pfmspdbl1*. Gel de agarose mostrando o tamanho do fragmento dos produtos de PCR. Linha 1: marcador molecular de 1Kb. Linhas 2 a 7: amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* de CZS, ML e GJ. Linha 8: controle positivo da reação de PCR (amostra de cultura *in vitro* de *P. falciparum*). Linha 9: controle negativo.

Para a MSPDBL-2, 49 isolados foram amplificados com êxito para o domínio SPAM, permitindo a visualização de um fragmento de aproximadamente 600 pb no gel de agarose, como pode ser observado na figura 11.

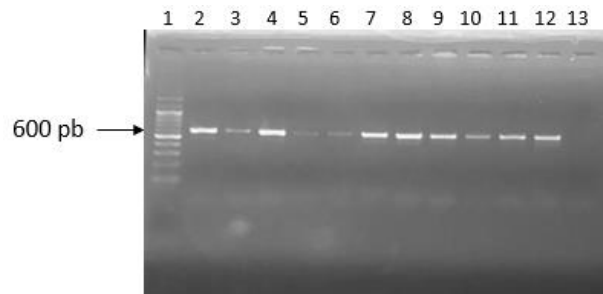


Figura 11- Amplificação por PCR do domínio SPAM do gene *pfmspdbl2*. Gel de agarose mostrando o tamanho do fragmento dos produtos de PCR. Linha 1: marcador molecular de 100 pb. Linhas 2 a 11: amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* de CZS, ML e GJ. Linha 12: controle positivo da reação de PCR (amostra de cultura *in vitro* de *P. falciparum*). Linha 13: controle negativo

A respeito do domínio DBL, foram amplificadas com sucesso 33 isolados, possibilitando a visualização de um fragmento entre 1.000 e 1.100 pb (figura 12).

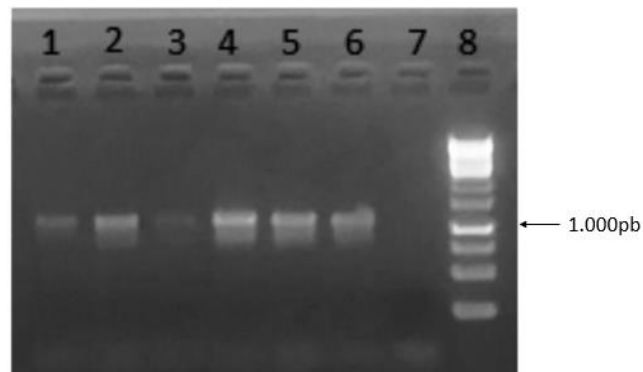


Figura 12 - Amplificação por PCR do domínio DBL do gene *pfmspdbl2*. Gel de agarose mostrando o tamanho do fragmento dos produtos de PCR. Linha 1 a 5: amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* de CZ, ML e GJ. Linha 6: controle positivo da reação de PCR (amostra de cultura *in vitro* de *P. falciparum*). Linha 7: controle negativo. Linha 8: marcador de peso molecular de 1.000 pb.

Para melhor caracterizar o perfil polimórfico das regiões gênicas que codificam as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 nos isolados brasileiros, as amostras amplificadas por PCR foram submetidas a reação de sequenciamento.

4.2.2 Análise do polimorfismo genético da MSPDBL-1 em isolados brasileiros por meio da reação de sequenciamento

As sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com a sequência referência de *P. falciparum* (3D7) disponível no banco de dados NCBI (pf3D7_1035700).

Nessa etapa, 43 dos 45 isolados amplificados por PCR foram sequenciados com sucesso para o domínio SPAM. Todos os isolados apresentaram alto grau de similaridade quando comparada com a sequência referência. Entretanto, foi possível observar 12 mutações de um único nucleotídeo em 12 posições específicas (1523, 1524, 1574, 1867, 1973, 1974, 1983, 2004, 2005, 2024, 2025 e 2026), como mostradas na tabela 4.

Tabela 4 - Mutações encontradas no domínio SPAM do gene *pfmspdbl1*: posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos

DOMÍNIO SPAM MSPDBL-1				
Localização		Códon Selvagem	Códon Mutado	Frequência n=43
Posição no Gene	AA			
A1523G	D508G/E	GAT	GGA	1 (2,32%)
T1524A_G	D508G/E	GAT	GAG	3 (6,98%)
T1574C	L525S	TTA	TCA	6 (13, 95%)
A1867G	K623E	AAG	GAG	28 (65,11%)
A1973G	E658G	GAA	GGG	3 (6,98%)
A1974G	E658G	GAA	GAG	3(6,98%)
T1983C	N661N	AAT	AAC	28 (65,11%)
A2004G	K668k	AAA	AAG	2 (4,65%)
A2005G	K669G	AAA	GAA	2 (4,65%)
A2024T	N675I	AAT	ATA	2 (4,65%)
T2025A	N675I	ATT	ATT	2 (4,65%)
G2026T	D676Y	GAT	TAT	2 (4,65%)
SNPs Sinônimos: 2				
SNPs Não sinônimos: 10				
S:Serina; T:Treonina; N:Asparagina; D:Ácido Aspártico; R:Arginina; K:Lisina; I:Isoleucina; G:Glicina; V:Valina; L:Leucina; Q:Glutamina; E:Ácido Glutâmico; F:Fenilalanina; P:Prolina; A:Alanina; H:Histidina; C:Cisteína; K: Lisina; W: Triptofano				

Com exceção do SNP na posição 1523 que ocorreu em apenas 1 isolado, os outros polimorfismos ocorreram em pelo menos 2 isolados. É possível observar que em 6 isolados o SNP ocorreu em duas posições do mesmo códon (1523/1524, 1973/

1974 e 2024/2025). Embora a sequência do domínio SPAM do gene *pfmspdbl1* tenha demonstrado elevado grau de conservação, 74,42% dos isolados estudados apresentaram ao menos 1 SNP em relação à sequência referência. Conforme observado na figura 13, a mutação não sinônima A1867G, a qual representa a substituição de lisina por glutamato, e a mutação sinônima T1983C estiveram presentes em 65,11% dos isolados estudados, enquanto a mutação A1523G foi a menos frequente, estando presente em apenas 1 isolado. Apenas duas mutações sinônimas foram encontradas, T1983C e A2004G.

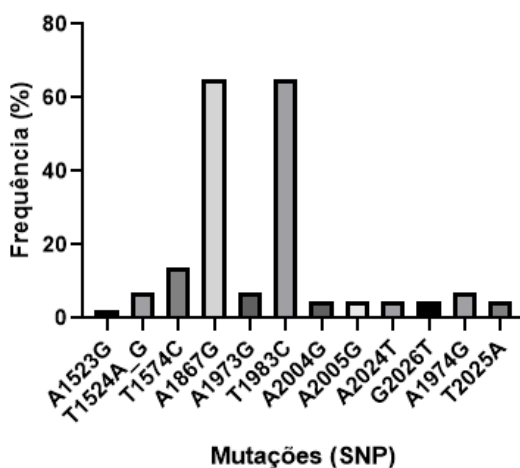


Figura 13 - Análise da diversidade genética do domínio SPAM do *pfmspdbl1* nos isolados de *P. falciparum* coletados em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará.

Em relação as áreas endêmicas estudadas, a maior frequência observada de A1867G e T1983C foi mantida em todas as localidades (figura 14). A maior diversidade foi observada em Cruzeiro do Sul, com 12 mutações entre os 22 isolados, enquanto Mâncio Lima e Guajará apresentaram 4 mutações cada.

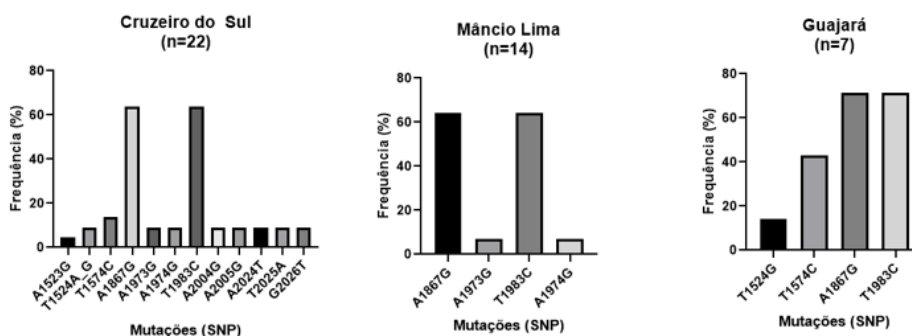


Figura 14 - Análise da diversidade genética do domínio SPAM do gene *pfmspdbl1* por localidade

Quanto ao domínio DBL, das 43 amostras amplificadas, 31 foram sequenciadas com sucesso. Mesmo apresentando alta similaridade com a cepa referência 3D7, foi possível observar o perfil polimórfico desses isolados que apresentaram 40 mutações de nucleotídeo único, 34 não sinônimas e 6 sinônimas (tabela 5).

Tabela 5 - Mutações encontradas no domínio DBL no gene *pfmspdbl1*: posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos

DOMÍNIO DBL MSPDBL-1				
Localização		Códon Selvagem	Códon Mutado	Frequência n=31
Posição no Gene	AA			
G523A	A175T	GCT	<u>A</u> CT	23 (74,19%)
T525G	A175A	GCT	G <u>C</u> G	7 (22,58%)
A541C	T181P	ACT	<u>C</u> CT	4 (12,90%)
T560C	L187P	CTT	<u>C</u> CC	2 (6,45%)
T561C	L187P	CTT	<u>C</u> CC	2 (6,45%)
G593A	R198K	AGA	<u>A</u> AA	14 (45,16%)
A698T	I200F	ATT	<u>I</u> TT	4 (12,90%)
A614T	H205L	CAT	<u>C</u> TT	3 (9,67%)
G628A	E210K	GAG	<u>A</u> AG	2 (6,45%)
G646A	E216L	GAA	<u>A</u> AA	6 (19,35%)
A692G	H231R	CAT	<u>C</u> GT	5 (16,12%)
A723G	T241T	ACA	<u>A</u> CG	6 (19,35%)
A731G	K244R	AAA	<u>A</u> GA	1 (3,22%)
G745A	D249N	GAT	<u>A</u> AT	7 (22,58%)
A789G	Q263Q	CAA	<u>C</u> AG	3 (9,67%)
C829G	R277G	CGT	<u>G</u> GT	23 (74,19%)
T871G	W291G	TGG	<u>G</u> GG	3 (9,67%)
C985T	L329F	CTT	<u>I</u> TT	2 (6,45%)
A1021C	S341R	AGC	<u>C</u> GC	4 (12,90%)
G1045A	D349N	GAT	<u>A</u> AT	31 (100%)
A1054G	K352E	AAA	<u>G</u> AA	31 (100%)
A1066G	I356V	ATC	<u>G</u> TA	31 (100%)
C1068A	I356V	ATC	<u>G</u> TA	31 (100%)
C1069A	Q357R	CAA	<u>A</u> GA	31 (100%)
A1070G	Q357R	CAA	<u>A</u> GA	31 (100%)
T1075A	F359I	TTT	<u>A</u> TT	31 (100%)
A1078T	T360S	ACA	<u>I</u> CA	1 (3,22%)
G1087A	D363N	GAT	<u>A</u> AT	31 (100%)
T1092A	D364E	GAT	<u>G</u> AA	23 (74,19%)
A1095C	S365S	TCA	<u>T</u> CC	7 (22,58%)
A1117G	K373E	AAG	<u>G</u> AG	8 (25,80%)
A1133G	E378G	GAA	<u>G</u> GT	31 (100%)
A1134T	E378G	GAA	<u>G</u> GT	31 (100%)
A1137C	A379P	GCA	<u>C</u> CC	6 (19,35%)

A1145C	H382P	CAT	<u>CCT</u>	8 (25,80%)
C1188T	G396G	GGC	<u>GGT</u>	31 (100%)
T1241G	I414R	ATA	<u>AGA</u>	31 (100%)
A1253T	K418I	AAA	<u>ATA</u>	31 (100%)
A1310C	T437T	ACA	<u>ACC</u>	2 (6,45%)
A1326T	K442N	AAA	<u>AAT</u>	7 (22,58%)
SNPs Sinônimos: 6				
SNPs Não sinônimos: 34				
S:Serina; T:Treonina; N:Asparagina; D:Ácido Aspártico; R:Arginina; K:Lisina; I:Isoleucina; G:Glicina; V:Valina; L:Leucina; Q:Glutamina; E:Ácido Glutâmico; F:Fenilalanina; P:Prolina; A:Alanina; H:Histidina; C:Cisteína; K: Lisina; W: Triptofano				

Interessantemente, 12 polimorfismos (G1045A, A1054G, A1066G, C1068A, C1069A, A1070G, G1087A, A1133G, A1134T, C1188T, T1241G, A1253T) ocorreram em 100% dos isolados estudados (figura 15), enquanto dois polimorfismos (A731G e A1878T) estiveram presentes em apenas um isolado. Logo, mesmo apresentando grande similaridade com a sequência referência, foram observadas mutações de nucleotídeo únicos nos isolados das três áreas incluídas no estudo.

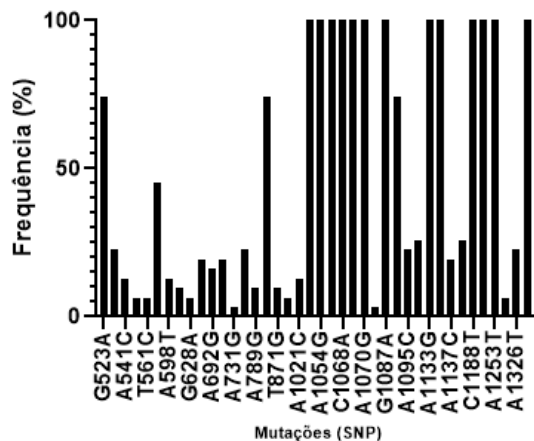


Figura 15 - Análise da diversidade genética do domínio SPAM da *pfmspdbl1* nos isolados de *P. falciparum*

Ao analisarmos os polimorfismos em relação as localidades, percebe-se que a localidade estudada com a maior quantidade de mutações é Mâncio Lima com 37 mutações, seguida de Cruzeiro do Sul com 35 polimorfismos e Guajará com 27 SNPs (figura 16).

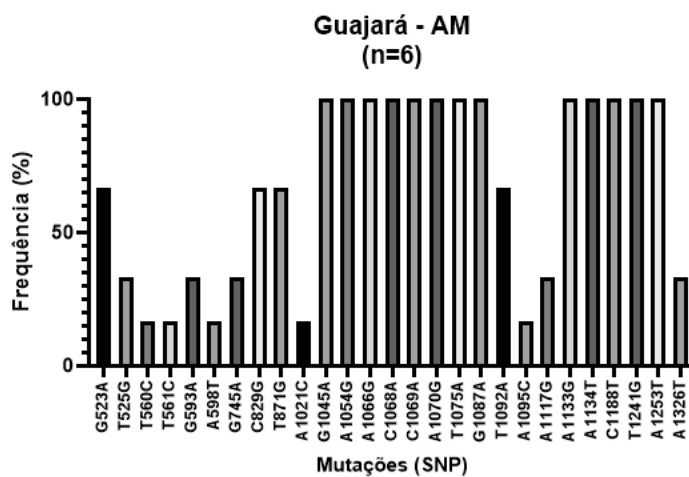
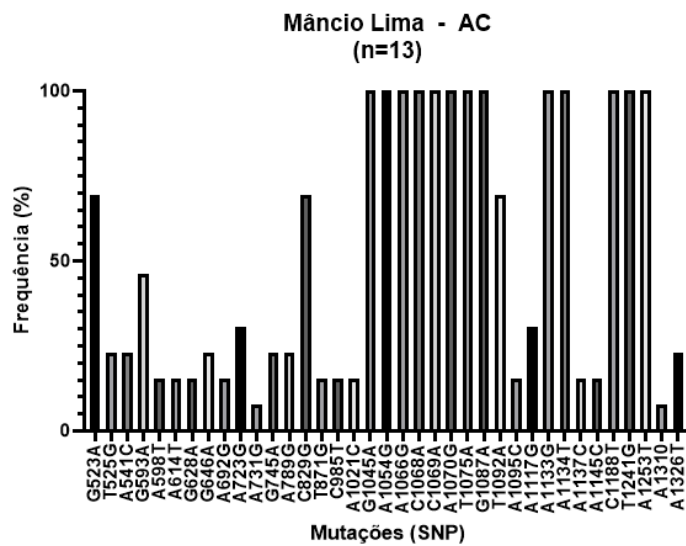
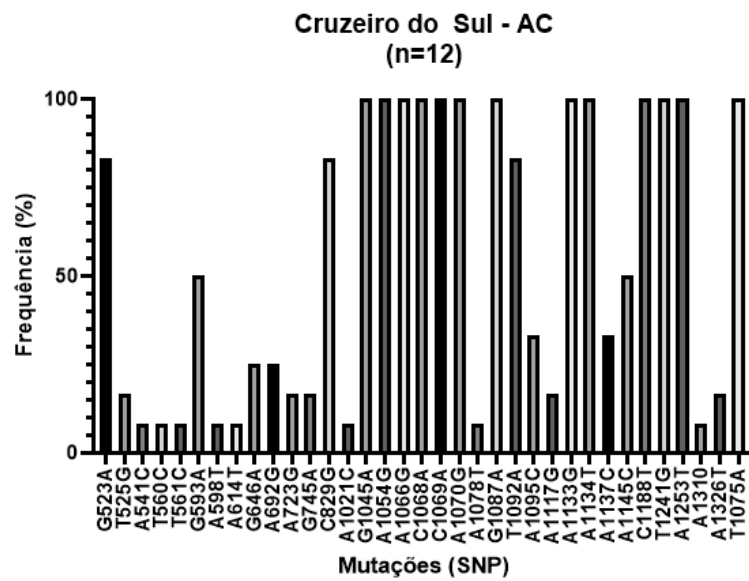


Figura 16 - Análise da diversidade genética do domínio DBL do gene *pfmspdbl1* por localidade

Quando comparamos a maior quantidade (número de mutações do domínio SPAM + número de mutações do domínio DBL) de mutações dos dois domínios (SPAM e DBL) em relação a localidade estudada, Cruzeiro do sul apresentou a maior diversidade de mutações, seguido de Mâncio Lima e Guajará (figura 17).

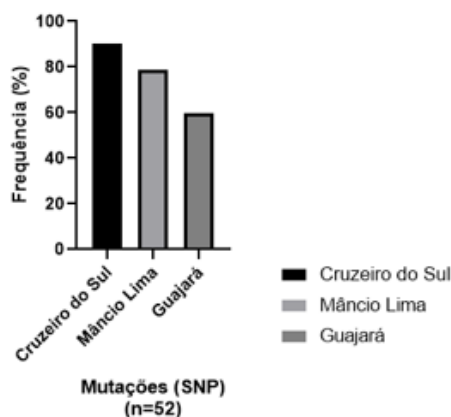


Figura 17 - Frequência de mutações do gene *pfmspdbl1*. Número total de mutações do gene que codifica a MSPDBL-1 por localidade (SPAM+DBL)

4.2.3 Análise do polimorfismo genético da MSPDBL-2 em isolados brasileiros por meio da reação de sequenciamento

As sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com a sequência referência de *P. falciparum* (3D7) disponível no banco de dados NCBI (PF3D7_1036300)

Dos 49 isolados amplificados, 33 foram sequenciados possibilitando a análise de polimorfismos do domínio SPAM nas sequências obtidas. Após o alinhamento com a sequência referência 3D7 foi observado alto grau de similaridade entre as sequências. Pode-se perceber uma mutação de único nucleotídeo na posição do gene A1955G (tabela 6) em 78,8% dos isolados estudados, resultando em uma mutação não sinônima (figura 18a). Foram observadas também mutações nas posições A2188C e C2189T que resultam na alteração em um mesmo códon em 9,09% dos isolados estudados.

Tabela 6 - Mutações encontradas no domínio SPAM do gene *pfmspdbl2*: posição dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos

DOMÍNIO SPAM MSPDBL-2				
Localização		Códon Selvagem	Códon Mutado	Frequência n=33
Posição no Gene	AA			
A1931G	E644G	GAA	<u>GG</u> A	26 (78,8%)
A2188C	T730L	ACT	<u>CC</u> T	3 (9,09%)
C2189T	T730L	ACT	<u>CC</u> T	3 (9,09%)
SNPs Sinônimos: 0				
SNPs Não sinônimos: 3				

G:Glicina; E:Ácido Glutâmico; T: Treonina; L: Leucina

Em relação as áreas endêmicas estudadas, todas elas apresentaram a mutação A1955G, tendo a maior frequência da mutação sido observado em Guajará (100%) (figura 18b).

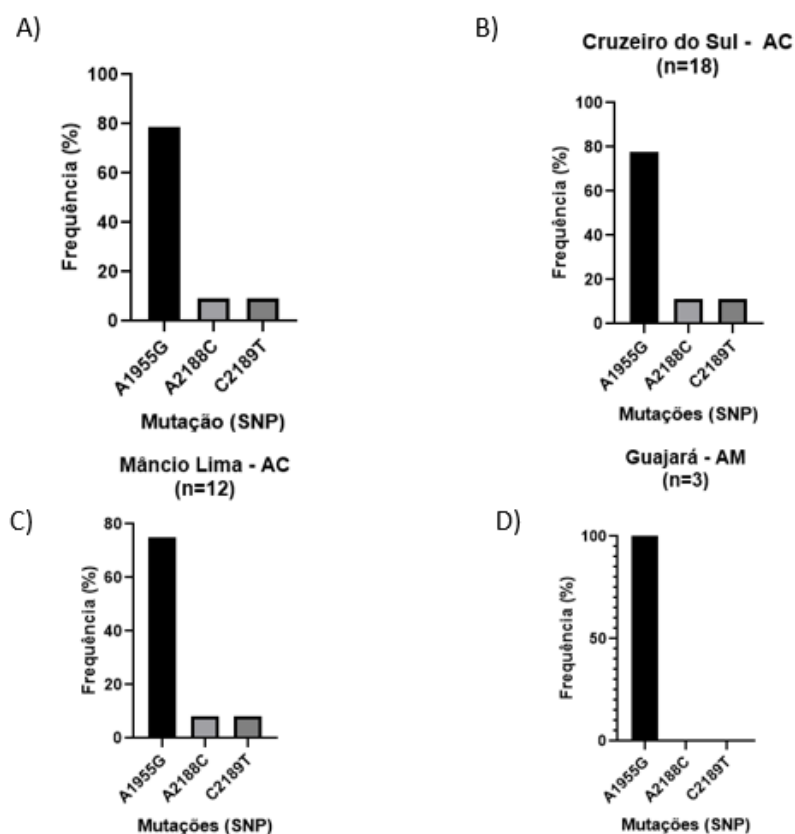


Figura 18 – A) Análise da diversidade genética do domínio SPAM do *pfmspdbl2* nos isolados de *P. falciparum* coletados em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará. B - D Frequência das mutações observadas por localidade.

Com o objetivo de analisar o perfil polimórfico da porção gênica do domínio DBL do gene *pfmspdbl2*, os isolados amplificados foram posteriormente sequenciados (n=17) e alinhados com a sequência referência depositada no *GenBank*TM. A análise do sequenciamento evidenciou uma única mutação na posição A1290C em 29,4% dos isolados estudados, resultando em uma mutação sinônima (tabela 7). Todos os isolados analisados apresentaram a sua sequência idêntica a sequência referência 3D7.

Tabela 7 - Mutações encontradas no domínio DBL do gene *pfmspdbl2*: posição dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos

DOMÍNIO DBL MSPDBL-2				
Localização		Códon Selvagem	Códon Mutado	Frequência n=33
Posição no Gene	AA			
A1290C	T430T	ACA	<u>ACC</u>	5 (29,4%)
SNPs Sinônimos: 1				
SNPs Não sinônimos: 0				
T: Treonina;				

Em relação as áreas endêmicas estudadas, todas elas apresentaram a mutação A1290C, tendo a maior frequência da mutação sido observado em Guajará (3 isolados), Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima apresentaram apenas um isolado com essa mutação.

4.3 Frequência de variantes encontradas na população de estudo

Ao analisarmos as sequências obtidas, foi possível observar que apenas 11 isolados analisados para o domínio SPAM da MSPDBL-1 (25,58%), mantiveram suas sequências idênticas a cepa referência 3D7. Considerando a sequência referência 3D7 como variante selvagem (VS), as mutações observadas nos isolados resultaram em 9 sequências diferentes, aqui denominadas variantes (tabela 8). Entre todos os isolados estudados a variante V1s1 (a saber: Variante 1 do domínio SPAM da MSPDBL-1) foi a mais frequente, enquanto as variantes V2s1, V3s1, V5s1, V6s1, V7s1, V8s1, V9s1 apresentaram menor frequência quando comparadas com a VS. É possível observar que a VS está presente nas 3 localidades assim como a V1s1, no entanto as variantes V2s1, V3s1, V5s1, V6s1, V7s1, V8s1, V9s1 estavam presentes

em apenas um município (V2s1,V3s1,V5s1 e V6s1 em Cruzeiro do Sul; V7s1 em Mâncio Lima; V8s1 e V9s1 em Guajará) (figura 19). As sequências das variantes podem ser conferidas no anexo VI. Quando observadas por localidade, Cruzeiro do Sul, Guajará e Mâncio Lima apresentaram 7, 5 e 3 variantes, respectivamente.

Tabela 8 - Variantes encontradas na população do domínio SPAM da MSPDBL-1

Variantes na população de estudo - domínio SPAM MSPDBL-1	
ATTAAATAAATG	VS
ATTGAACAAATG	V1
ATTGGGCGGTAT	V2
GATAAATAAATG	V3
ATCGAACAAATG	V4
AGTGAACAAATG	V5
ATCAGGTGGTAT	V6
ATTAGGTAAATG	V7
AGCGAACAAATG	V8
ATCAAATAAATG	V9

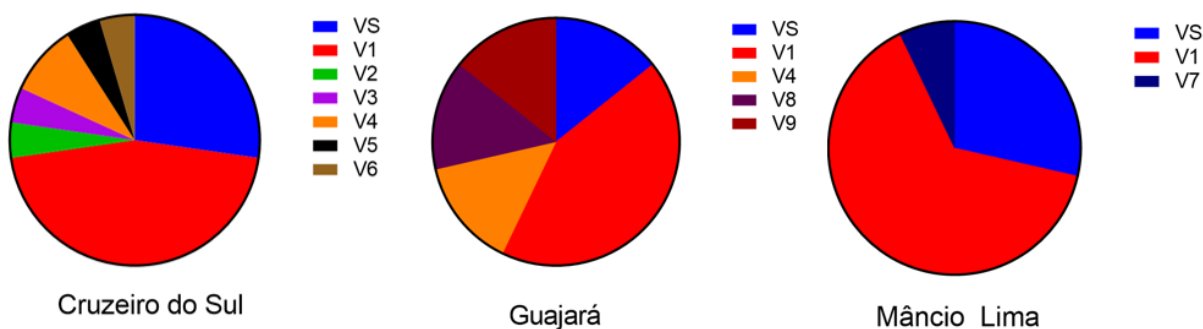


Figura 19 - Frequência das variantes por localidade SPAM MSPDBL-1

A respeito do domínio DBL, nenhum isolado manteve a sua sequência idêntica a cepa referência 3D7. Foram observadas 28 variantes diferentes (tabela 9), tendo apenas a variante que denominamos de V1d1 (a saber: V1 do domínio DBL da MSPDBL-1) a única que foi observada quatro vezes: Duas vezes em Cruzeiro do Sul, uma em Mâncio Lima e uma em Guajará (figura 20). As outras variantes apareceram cada uma apenas uma vez. O mapa das alterações nucleotídicas podem ser conferidas no anexo VI.

Tabela 9 - Variantes encontradas na população do domínio DBL da MSPDBL-1

Variantes na população de estudo - domínio DBL MSPDBL-1	
GTATTGAAGGAAAGACTCAGAACCATAGTAAAAACTAAA	VS
ATATTGAAGGAAAGAGTCAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V1
ATATTGAAGGGAAGAGTCAAGGAAGATAACAGTAATGTAA	V2
ATATTGAAGGGAAGAGTCAAGGAAGAAAACAGTCCTGTAA	V3
AGACCGAAGGAAAGAGTCAAGGAAGAAAAAGTAATGTCA	V4
ATATTGAAGGAGAGAGTCAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V5
GTATTAAGGAAAGACTCAAGGAAGAAATAGGTAATGTAT	V6
ATATTAAGGAAAGAGTCAAGGAAGAAAAAGTACTGTAA	V7
ATCTTAAGAAGAAAGTCAAGGAAGAAAAAGTACTGTAA	V8
ATATTATTGGGAAAAGTCAAGGAAGAAAACAGTCCTGTAA	V9
AGATTAAGGAAAGAGTCAAGGAAGAAAAAGTCCTGTAA	V10
GTATTAAGGAAAGACTCCAGGAAGAAATCGGTCCTGTAT	V11
ATATTGAAGGAGAGGGCAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V12
ATATTAAGGAAAGAGTCAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V13
ATCTTATTAAGAAAAGTCCAGGAAGAAAACAGTCCTGTAA	V14
ATATTGAAGGAAAGAGTTAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V15
GTATTGAAGGAAAGACTCAAGGAAGAAATAGGTAATGTAA	V16
GGCTTATTAAGGAAACTCAAGGAAGAAATAGGTCCTGTAT	V17
ATATTAAGGAAAGAGTCAAGGAAGAAAACAGTAATGTAA	V18
ATATTAAGGAGAGGGTCAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V19
GTCTTGAAGGAAAACTCCAGGAAGAAATAGGTAATGTAT	V20
GTATTAAGGAAGGGCGCAAGGAAGAAATAGGTAATGTAT	V21
AGATTGAAGGAAAGAGTCAAGGAAGAAAAAGTAATGTCA	V22
AGATTGAAGGAAAGAGTTAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V23
ATATTAAGGAAAAAGTCAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V24
ATATTGAAGGAAAGAGGCAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V25
GGATTATAGGAAAACTCCAGGAAGAAATCGGTAATGTAT	V26
GTATTGAAGGAAAGACTCAAGGAAGAAATAGGTAATGTAT	V27
AGACCGAAGGAAAGAGTCAAGGAAGAAAAAGTAATGTAA	V28

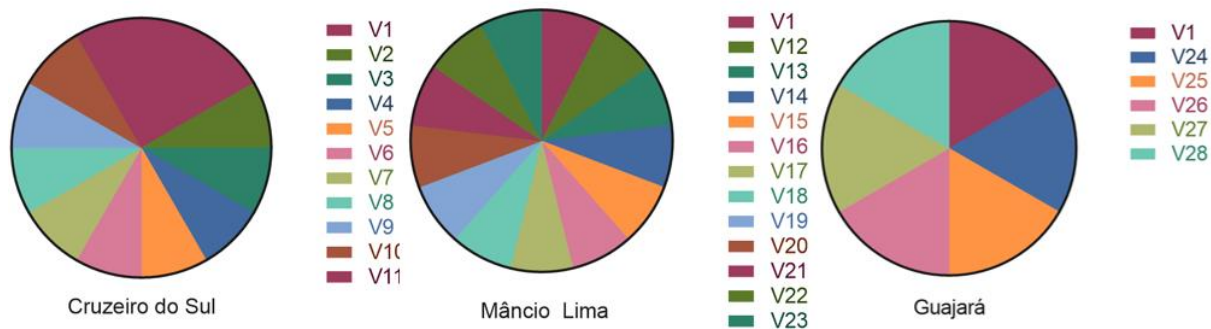


Figura 20- Frequência das variantes por localidade DBL MSPDBL-1

Ao analisarmos a diversidade genética do domínio SPAM da MSPDBL-2 apenas sete isolados (21,2%) mantiveram a sua sequência idêntica a sequência referência na posição 1955. Nos outros isolados, a mutação resultou em uma variante diferente (a saber: variante um do domínio SPAM da MSPDBL-2), que esteve presente em todas as localidades estudadas. As sequências para o domínio SPAM da MSPDBL-2 podem ser conferidas no anexo VI.

Tabela 10 - Variantes encontradas na população do domínio SPAM da MSPDBL-2

Variantes na população de estudo - domínio SPAM MSPDBL-2	
A	VS
G	V1

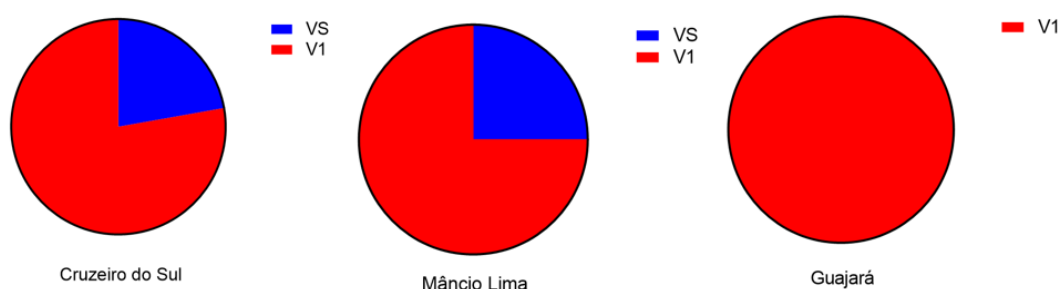


Figura 21 - Frequência das variantes por localidade SPAM da MSPDBL-2

O domínio DBL se apresentou mais conservado com apenas uma mutação sinônima, resultando em duas variantes diferentes. A primeira igual a sequência referência 3D7 e cinco com uma mutação na porção C-terminal. Os alinhamentos podem ser conferidos no Anexo VI.

Tabela 11 - Variantes encontradas na população do domínio DBL da MSPDBL-2

Variantes na população de estudo - domínio DBL MSPDBL-2	
A	VS
C	V1

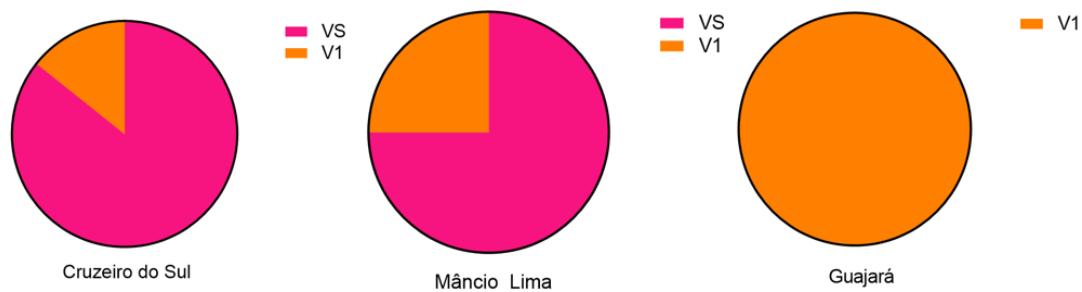


Figura 22 - Frequência das variantes por localidade DBL da MSPDBL-2

4.4 Análise genética da população

Após o alinhamento com a sequência do gene *pfmspdbl1* com a sequência referência 3D7 foram identificados 40 SNPs diferentes. Seis destes sinônimos e 34 não sinônimos. A diversidade de nucleotídeos (π) para o domínio SPAM da *pfmspdbl1* foi menor ($0,00402 \pm 0,00088$) quando comparado ao domínio DBL ($0,00888 \pm 0,00106$), como pode ser observado na tabela 12. Do mesmo modo, a diversidade de haplótipos (H_d) também foi maior no domínio DBL ($0,987 \pm 0,015$). Para avaliar se há pressão seletiva no gene *pfmspdbl1* foi realizado o teste D de Tajima. Os valores foram 0,21911 e -0,94999, e não se mostraram significativos, indicando de que não há seleção significativa nos domínios do gene *pfmspdbl1*. Além de analisar as sequências dos fragmentos gênicos que codificam os domínios da DBL e SPAM da MSPDBL-1 separadamente, também foi analisada a região gênica completa que codifica a MSPDBL-1. Porém não foi possível sequenciar o mesmo número de amostras para os dois domínios. Podemos observar que a diversidade nucleotídica (π) da região codificadora da proteína MSPDBL-1, foi $0,00430 \pm 0,00054$ (tabela 12), menor que o domínio DBL e igual ao domínio SPAM, quando analisados separadamente. A diversidade haplotípica ($0,994 \pm 0,011$) foi ligeiramente maior que o domínio DBL sozinho e o resultado do teste de neutralidade permaneceu não significativo, demonstrando não haver seleção significativa no gene *pfmspdbl1*.

Tabela 12 - Diversidade genética do gene *pfmspdbl1*

Análise genética de população do gene *mmspdbl-1* em isolados da Amazônia Brasileira

Parâmetros	Domínio DBL	Domínio SPAM	Gene (codificação inteira)
	(N = 31)	(N=43)	(N = 31)
Nº de Sítios Segregantes (S)	27	12	38
Diversidade Nucleotídica (π) \pm DP	$0,00888 \pm 0,00106$	$0,00402 \pm 0,00088$	$0,00430 \pm 0,00054$
Número médio de diferenças nucleotídicas (k)	7,17419	2,07752	9,00215
Nº de Haplótipos (h)	28	10	29
Diversidade Haplotípica (H_d) \pm DP	$0,987 \pm 0,015$	$0,680 \pm 0,061$	$0,994 \pm 0,011$
Teste Tajima (D)	$0,21911^{ns}$	$-0,94999^{ns}$	$-0,19569^{ns}$

DP = Desvio Padrão

^{ns} não significativo ($P > 0.10$)

A partir do alinhamento do gene *pfmspdbl2* com a sequência referência 3D7, observamos que o domínio DBL se mostrou conservado e o seu domínio SPAM evidenciou apenas 3 mutações. Assim, a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade haplotípicas (Hd) do domínio SPAM ($\pi= 0,00240 \pm 0,00067$ e $Hd= 0,447 \pm 0,093$, respectivamente) foram maiores que os observados domínio DBL (tabela 13). Foram observados 4 haplótipos e para o domínio SPAM e 2 haplótipos para o domínio DBL. O teste D de Tajima para o domínio SPAM foi -0,16614, destarte não apresentando seleção significativa nesse domínio. O domínio DBL apresentou o valor do teste de Tajima de 0,94981, entretanto também não foi significativo. Assim como fizemos para a proteína MSPDBL-1, também analisamos região gênica completa que codifica a MSPDBL-2. Pelo fato da impossibilidade de sequenciar um maior número de amostras para o domínio DBL da MSPDBL-2, e o número amostral ser extremamente baixo, apenas 15 isolados foram considerados para as análises, visto que eram os isolados que possuíam ambos os domínios sequenciados. É possível perceber que a diversidade nucleotídica da região codificadora da proteína MSPDBL-2 da MSPDBL-2 foi $0,00046 \pm 0,00015$ (tabela 13), menor que a dos dois domínios quando analisados separadamente. A diversidade haplotípica ($0,600 \pm 0,113$) foi ligeiramente maior que os domínio DBL e SPAM sozinhos e o resultado do teste de neutralidade permaneceu não significativo, demonstrando não haver seleção significativa no gene *pfmspdbl2*. Observando esses dado de diversidade nucleotídica e haplotípica podemos afirmar que a proteína MSPDBL-1 é mais diversa que a MSPDBL-2

Tabela 13 - Diversidade genética do gene *pfmspdbl2*

Análise genética de população do gene *mmspdbl-2* em isolados da Amazônia Brasileira

Parâmetros	Domínio DBL (N = 17)	Domínio SPAM (N = 33)	Gene (codificação inteira) (N = 15)
Nº de Sítios Segregantes (S)	1	3	4
Diversidade Nucleotídica (π) \pm DP	$0,00050 \pm 0,00011$	$0,00240 \pm 0,00067$	$0,00046 \pm 0,00015$
Número médio de diferenças nucleotídicas (k)	0,44118	0,68561	1,04762
Nº de Haplótipos (h)	2	4	4
Diversidade Haplotípica (Hd) \pm DP	$0,441 \pm 0,098$	$0,447 \pm 0,093$	$0,600 \pm 0,113$
Teste Tajima (D)	0,94981 ^{ns}	-0,16614 ^{ns}	-0,47574 ^{ns}

DP = Desvio Padrão
^{ns} não significativo (P > 0.10)

4.5 Substituições de aminoácidos das MSPDBL-1 e MSPDBL-2 nos isolados brasileiros

As sequências obtidas no presente estudo para a proteína MSPDBL-1 foram alinhadas e comparadas com a sequência referência 3D7 (anexo VII) e com isolados circulantes em diferentes regiões da Ásia e da África (figuras 23 e 24). Podemos perceber alterações de aminoácidos em nosso estudo que também foram observados em isolados circulantes em regiões da África e da Ásia. Entretanto, nos isolados do nosso estudo foram observadas tanto alterações de aminoácidos que não haviam sido descritas nos isolados da África e Ásia, assim como foram observadas trocas de aminoácidos nesses isolados Africanos e Asiáticos que não foram evidenciadas no nosso estudo.

As sequências obtidas da proteína MSPDBL-2 no presente estudo foram alinhadas e comparadas com a sequência referência 3D7 (anexo VII). Porém, nenhum polimorfismo já descrito para essa proteína foi encontrado nos nossos isolados, assim como os polimorfismos observados no presente estudo para essa proteína não foram descritos em nenhuma localidade e estudo já publicado

Cepa	DBL																																																							
	169	175	181	187	193	198	200	205	210	216	231	241*	243	244	249	250	263*	277	291	303	329	341	349	352	356	357	359	360	363	364	365*	373	378	379	382	396*	401	402	404	414	418	442														
3D7	G	A	T	L	T	R	I	H	E	E	H	T	I	K	D	M	Q	R	W	F	L	S	D	K	I	Q	F	T	D	D	S	K	E	A	H	G	F	E	E	I	K	K														
GHANA1 (África)					K	Q																																																		
HB3 (Honduras)												M			I					I																																				
IT	R																	G								E	V	R	I		N				G									R	I											
D10 (PNG)																		G																																						
RO-33 (Ghana)		T																G						N	E			I		N			G											R	I											
D6 (Serra Leoa)					K	Q												G						N	E			I		N			E												R	I										
K1 (Tailândia)																		G						N	E																					R	I	I								
V1-S (Vietnã)		T																						N	E																															
Dd2																		G																													R									
(Indochina/Laos)																																																								
FCR3 (África)																								N	E				I		N															R	I									
Santa Lucia (El Salvador)																																																								
7G8 (Brasil)																																																								
Senegal 3404					K																																																			
FCB																																																								
A4 (Brasil)																		G						N	E	V	R	I		N			G														L	K	K	R	I					
FCR3CSA																		G						N	E	V	R	I		N			G															L	K	K	R	I				
ITG/ICAM	R																	G						N	E	V	R	I		N			G																L	K	K	R	I			
RAJ104	R																	G						N	E	V	R	I		N			G																	L	K	K	R	I		
CAL-3813																		G						N	E	V	R	I		N			G																		L	K	K	R	I	
Tm90C2A (Tailândia)					K													G														N		G																L	K	K	R	I	N	
JDP08																		G						N	E	V	R	I		N			G																			L	K	K	R	I
Isolados AEB		T/A	P	P		K	F	L	K	L	R	T		R	N		Q	G	G		F	R	N	E	I	V	R	I	S	N	E	S	E	G	P	P	G													R	I	N				

Nota: AEB = áreas endêmicas brasileiras. PNG = Papua Nova-Guiné. Sítios em vermelho representam sítios de troca de aminoácidos que não estão presentes nos isolados desse estudo, os sítios marcados com * representam substituições sinônimas. Sítios em cinza representam as trocas de aminoácidos que estão presentes em comum com o nosso estudo e os demais isolado. Sítios em preto significam trocas de aminoácidos vistas apenas no nosso estudo.

Figura 23 - Sítios de aminoácidos do domínio DBL da MSPDBL-1 presentes em isolados que circulam no Brasil, África e Ásia, comparando com a sequência referência 3D7.

Adaptado de Hodder et al., 2012 (85).

Cepa	SPAM								
	508	525	623	658	661*	668*	669	675	676
3D7	D	L	K	E	N	K	K	N	D
RO-33 (Ghana)			K						
A4 (Brazil)			K						
FCR3CSA			E						
ITG/ICAM			K						
RAJ104			K						
CAL-3813			E						
Tm90C2A (Thailandia)			K						
JDPO8			E						
Isolados AEB	G/E	S	E	G	N	K	E	I	Y

Nota: AEB = áreas endêmicas brasileiras. Sítios em cinza representam as trocas de aminoácidos que estão presentes em comum com o nosso estudo e os demais isolado. Sítios em preto significam trocas de aminoácidos vistas apenas no nosso estudo. Os sítios marcados com * representam substituições sinônimas.

Figura 24 - Sítios de aminoácidos do domínio SPAM da proteína MSPDBL-1 presentes no Brasil e em outras regiões do mundo. Adaptado de Wickramarachchi et al., 2004 e Hodder et al., 2012 (84,85).

DBL MSPDBL-2																																																	
Cepa	164	165	166	167	169	170	171	172	174	176	180	188	189	191	193	194	196	197	198	209	210	211	213	216	217	218	219	221	222	223	226	227	229	232	237	239	243	244	246	247	248	249	250	253	257	260			
3D7	T	E	E	I	K	D	F	S	L	Q	N	L	G	S	K	N	S	S	D	Q	S	L	L	T	L	Q	D	R	T	K	K	E	D	K	Y	S	R	K	R	T	I	H	N	L	H	I			
Ghana1 (África)	A	K	K	F	N	G	I	R	V	K		S	S	N	R		L	T	V	K	P	I	F	K	I	K	N	P	K	I	N		N	N	S	A	K	Q	I	N	L	Y	D	I	L	M			
HB3 (Honduras)	A		K								D		S	N		K																					K										L		
D10 (PNG)																																						K									L		
IT																																																	
RO-33 (Ghana)	A		K																																														
D6 (Serra Leoa)																												N						N	K														
K1 (Thailandia)	A		K								D		S	N		K																																	
V1-S (Vietnã)											D					K																																	
Dd2 (Indochina/laos)	A		K								D		S	N		K																																	

Figura 25 - Sítios de aminoácidos do domínio DBL da proteína MSPDBL-2 em outras regiões do mundo. Adaptado de Hodder et al., 2012 (85).

DBL MSPDBL-2																																																			
Cepa	261	263	271	272	274	277	283	284	286	291	294	295	296	297	298	300	301	302	308	311	312	314	315	316	319	327	328	329	333	336	341	355	363	366	377	381	383	385	399	409	420	426	435	439	448	452	457				
3D7	R	S	I	R	D	M	K	E	I	K	K	I	Y	N	E	N	D	K	K	T	E	R	H	H	E	S	A	Q	Q	G	D	T	K	N	P	A	P	L	K	T	N	T	E	E	K	Q	L				
Ghana1 (África)	K	G	V	K	N	I	N	K	K	E	R	N	H	Y	K	D	N	E		I	Q	K		R	D	N	E	K	K	Y	I																				
HB3 (Honduras)	K			K						E		L	H		K								Y						E	V			N	K	L	T	S	M	N	N	K	K	K	K	E	H	H				
D10 (PNG)	K			K						E												Y							E	V			N	K	L	T	S	M	N	N	K										
IT										E	R	N	H	Y	K	D	N	E	N	I	Q	K		R	D	N	E	K	K	Y	I																				
RO-33 (Ghana)																																																			
D6 (Serra Leoa)																																																			
K1 (Thailandia)																																																			
V1-S (Vietnã)																																																			
Dd2 (Indochina/laos)																																																			

Figura 26 - Sítios de aminoácidos do domínio DBL da proteína MSPDBL-2 em outras regiões do mundo (continuação da figura 25). Adaptado de Hodder et al., 2012 (85).

4.6 Modelagem molecular e predição de epítomos de células B e T

A modelagem molecular foi realizada por meio do programa *Robetta*, a partir da sequência referência para *P. falciparum* 3D7. Observando a diversidade identificada nos genes de interesse nesse estudo, os nossos dados indicam que esta é mais limitada no *pfmspdbl-2* e mais ampla no *pfmspdbl-1* em isolados de regiões endêmicas de malária brasileira. Contudo, as mutações não sinônimas encontradas podem ter impacto sobre o dobramento das proteínas assim como influenciar o potencial de epítomos preditos. A figura 21 ilustra os epítomos identificados dentro dos dois domínios estudados das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.

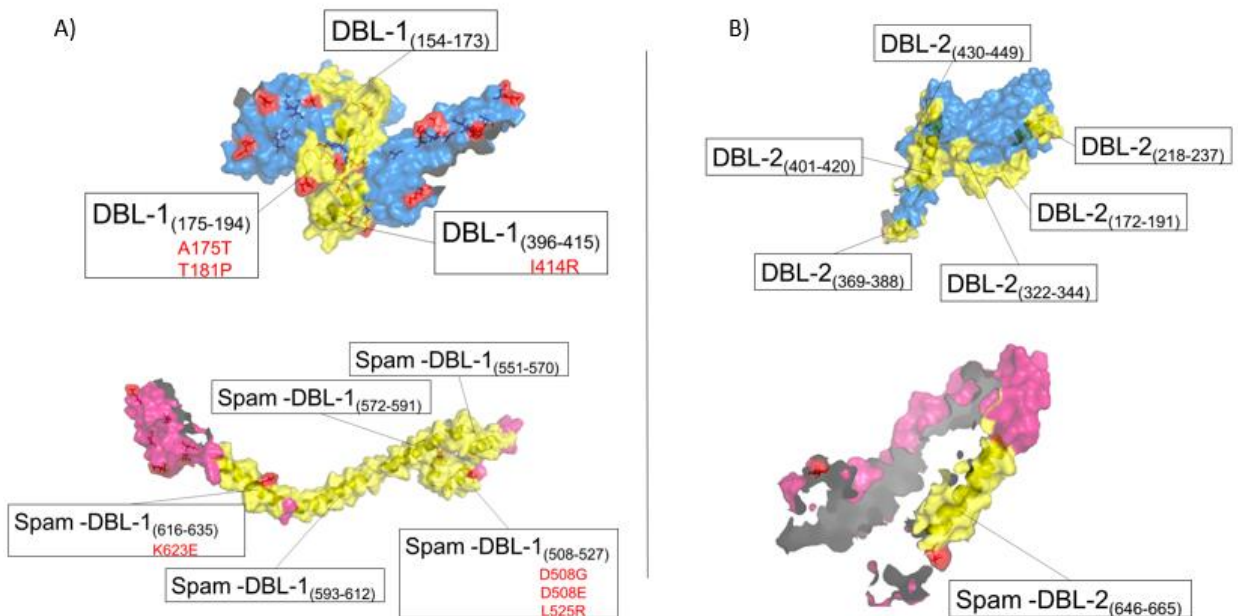


Figura 27 - Estrutura de modelagem e análise *in silico* de epítomos das MSPDBL-1 e MSPDBL-2. Os domínios DBL e SPAM estão destacados na cor amarela e o resto da proteína está nas colorações azul e rosa.

(A) Nos quadrados estão os epítomos preditos para MSPDBL-1. As mutações não sinônimas com as respectivas trocas de aminoácido que ocorreram em epítomos preditos da MSPDBL-1 estão destacadas em vermelho. (B) Nos quadrados estão os epítomos preditos para MSPDBL-2

As sequências completas das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram analisadas utilizando os algoritmos presentes no Banco de dados de Epítomos Imunes (IEDB) e BCpreds para a predição de epítomos, utilizando os seguintes parâmetros: 1) polaridade e hidrofobicidade (DNASTAR); 2) exposição na superfície (Escala de

acessibilidade a superfície) e 3) propensão antigênica de potenciais epítomos lineares presentes nas proteínas (Bcpred). Como mostrado na tabela 12, quinze potenciais epítomos lineares B com pelo menos vinte aminoácidos foram identificados nas proteínas inteiras (oito epítomos para a MSPDBL-1 e sete epítomos para a MSPDBL-2). As pontuações de predição variaram entre 0,54 e 1,4. Apenas mutações que ocorreram na MSPDBL-1 estavam inseridas em epítomos lineares de células B preditos. Levando em consideração que as mutações que ocorreram dentro dos epítomos (E1.175-194, E2.396-415, E10.616-635 e E11.508-527), analisamos os escores de predição dos epítomos para verificar se essas mutações resultavam em algum impacto. Na figura 20 é possível observar a localização dos epítomos na estrutura dos genes.

No domínio DBL da MSPDBL-1 as mutações A181P e I414R resultaram em um ligeiro aumento no escore de predição. Quando a mutação A175T ocorre sozinha, não há alteração no escore de predição, no entanto no momento que essa mutação ocorre em conjunto com a T181P, há um aumento no escore. Curiosamente, quando a mutação A171P ocorre em conjunto com a mutação A187P, o escore de predição cai drasticamente para além do ponto de corte do nosso estudo (0,5).

Ao analisarmos as mutações do domínio SPAM dentro dos epítomos preditos, verificamos que a mutação K623E resultou na diminuição do score, enquanto as mutações D508G e D508E, levaram a um ligeiro aumento. Interessantemente, a mutação L525R sozinha resultou em um grande aumento na pontuação predita, e quando em conjunto com a mutação D508E o aumento também foi expressivo.

Na análise da sequência da proteína inteira para a busca de epítomos T, quinze epítomos foram preditos (nove para MSPDBL-1 e seis para MSPDBL-2) (tabela 13), entretanto eles se mostraram conservados, visto que não foi observado nenhuma mutação não sinônima dentro dos epítomos. Treze epítomos TCD4⁺ apresentaram a pontuação consenso menor que 20 e foram preditos para serem reconhecidos por mais que 50% dos alelos de HLA testados. O epítomo EKFIYSYASSEARKL predito para a MSPDBL-2 foi considerado um possível epítomo de célula T, pois foi reconhecido com a frequência de 82% dos Antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (HLA).

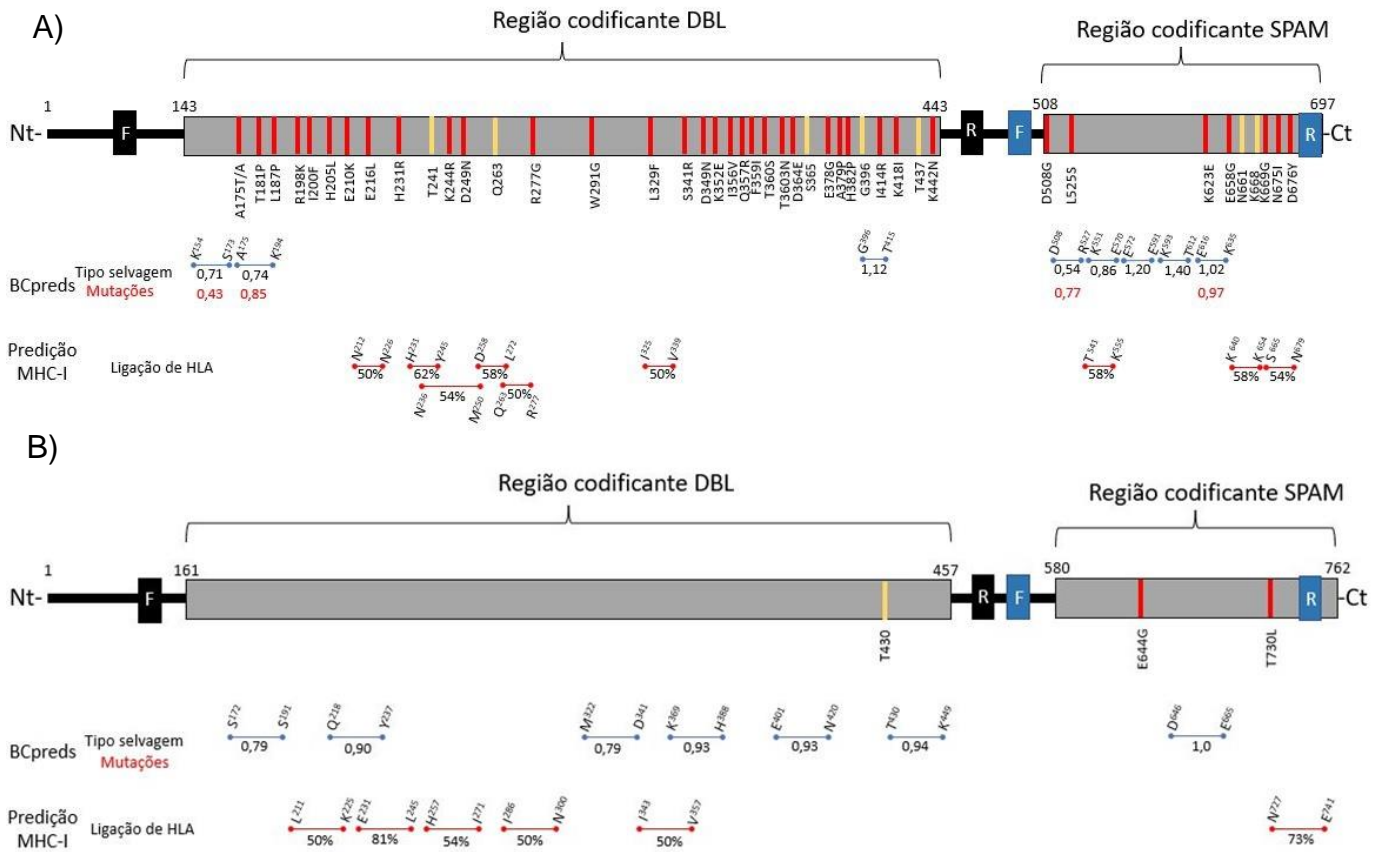


Figura 28 - Estrutura dos genes *pfmspdbl1* e *pfmspdbl2*.

Mutações sinônimas e não sinônimas encontradas em nossa população e outras mutações descritas foram ilustradas por barras vermelhas e barras amarelas, respectivamente, na estrutura da pfMSPDBL-1 (A) e -2 (B). Os quadrados pretos representam os pares de primers utilizados no domínio DBL e os quadrados azul os primers utilizados no domínio SPAM. As linhas azuis representam epítomos de células B lineares preditos. A letra e o número de cada epítomo indicam o aminoácido C-terminal e N-terminal. Os valores de BepiPred representam o escore predito de epítomo linear de células B em haplótipo de tipo selvagem (H1) em relação ao mutante (número vermelho). A ferramenta de análise IEDB MHC-I indica a respectiva frequência de ligação de HLA entre 27 HLA avaliados.

Tabela 14 - Epítomos de células B lineares preditos

Epítomos de célula B				
Proteína	Epítopo	aa Inicial	aa Final	Sequência
PfMSDBL-1 DBL (143-443)	E1	175	194	AVKESSTTNKGVLVPPRRTK
	E2	396	415	GQCDKFEKEKSKYEDTKSIT
	E3	154	173	KNVLSCPPKNSTGRNGDWIS
PfMSPDBL-1 SPAM (508-607)	E14	572	591	EEQQEDIEEEDDEELENEGEE
	E10	616	635	EDIEEENKEKELSNQQQSEK
	E13	593	612	KEEDDEEKNETNDTEDTDDT
	E11	508	527	DNVNSVTQRGNNNYNNNLER
	E12	551	570	KLTSKDEEDIKHNEDVREE
PfMSPDBL-2 DBL (161-457)	E7	430	449	TLSPSEYLIEKCPECKCTKK
	E9	369	388	KAVCFPKQPRTEANPALTVH
	E5	401	420	EEWYNKRKTEWTEQSIKYNN
	E4	218	237	QDFRTKKKKEGDFEKFIYSY
	E6	172	191	SNLPQCRKNVHERNNWLGSS
	E8	322	341	MCGYQSAQKDNQCTGYGNID
PfMSPDBL-2 SPAM (636-732)	E15	646	665	DIEEETEEETEEETEEEADE

Tabela 15 - Epítomos de células T lineares preditos

Epítomos de célula T CD4				
Proteína	aa Inicial	aa Final	Sequência	Frequência de HLA respondedores
PfMSDBL1 DBL (143-443)	89	103	HYKEKNLNALTAIKY	62%
	116	130	DLIDYQITKNINRAL	58%
	94	108	NLNALTAIKYGFSDM	54%
	70	84	NFKEEFVKVALGESN	50%
	183	197	IPQYLRWFREWGTYV	50%
	121	135	QITKNINRALDKILR	50%
PfMSPDBL2 DBL (161-457)	71	85	EKFIYSASSEARKL	81%
	97	111	HQAIRYSFADIGNII	54%
	51	65	LCLRITLQDFRTKKK	50%
	183	197	IPQFLRWFREWGTYV	50%
	126	140	ITYLEKVLKIYNENN	50%
PfMSPDBL1 SPAM (508-607)	133	147	KVDEDSYRILSVSYK	58%
	34	48	TEEKYSLELIKLTSK	58%
	158	172	SIVKKLFLFNDNNN	54%
PfMSPDBL2 SPAM (636-732)	727	741	NVHTLVNSIISLLEE	73%

5 DISCUSSÃO

A luta contra a malária tem sido cada vez mais problemática devido á crescente resistência do *Plasmodium* sp. aos antimaláricos e à dispersão de anofelinos resistentes aos inseticidas, ressaltando a importância de estratégias alternativas para o controle da malária no mundo. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma vacina antimalárica eficaz, capaz de induzir resposta imune estéril e duradoura torna-se a melhor ferramenta para combate a essa doença. Como a patogenia da malária é decorrente do estágio eritrocítico do ciclo, as vacinas que são direcionadas ao estágio sanguíneo assexuado se tornam promissoras visto que elas impediriam a doença clínica diminuindo assim a sua morbidade e mortalidade (118). Entretanto, talvez o maior desafio em desenvolver uma vacina focada no estágio eritrocítico assexuado seja a extensa diversidade genética, principalmente em proteínas expressas na superfície do parasito, que estão sob pressão constante do sistema imune do hospedeiro (119).

A extensa diversidade genética do *P. falciparum* permanece como um obstáculo para alcançar a eliminação da malária. Diversos ensaios clínicos com variados antígenos mostraram eficácia limitada das intervenções em diferentes tempos e regiões geográficas devido aos polimorfismos genéticos presentes nesse parasito (120,121). O genoma do *Plasmodium* sp. apresenta polimorfismos de nucleotídeo único que ocorrem em posições específicas. Foram descritos aproximadamente 112.000 SNPs em seu genoma, que são considerados bons marcadores moleculares para a identificação e caracterização da sua diversidade genética (122,123).

As proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são dois membros incomuns da família PfMSP-3. Essas proteínas são expressas na superfície do merozoíto, aparentemente não apresentam domínio transmembrana ou ancoramento por GPI e se associam periféricamente com outras MSPs para a formação de um complexo na superfície do merozoíto. Embora a sua função biológica ainda não tenha sido completamente elucidada, elas apresentam um papel na ligação do merozoíto com o eritrócito (84). Estudos realizados em áreas de alta endemicidade de malária mostraram que anticorpos contra as MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão associados com a proteção contra malária clínica (86,94) e que esses anticorpos são capazes de inibir o crescimento do parasito *in vitro*, sugerindo seu importante papel na imunidade antimalárica (80,86,95). Considerando que a extensa diversidade genética exibida

pelo *P. falciparum* pode ser um fator importante para a evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro (41), a presença de polimorfismos nas regiões genéticas que codificam as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 pode modular as respostas imune celular e humoral específicas. Assim, a identificação e avaliação de polimorfismos nas regiões potencialmente antigênicas das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em isolados de *P. falciparum* que circulam em áreas endêmicas brasileiras torna-se de fundamental importância visto que os isolados que circulam no Brasil podem apresentar características genéticas diferentes dos isolados que circulam em outras áreas endêmicas de malária. Assim, no presente estudo nos propomos identificar e avaliar os polimorfismos em genes que codificam as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 isolados de *P. falciparum* que circulam em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira, com diferentes níveis de transmissão. A avaliação da diversidade genética pode contribuir e ressaltar o potencial das proteínas MSPDBL-1 e -2 como candidatas a vacina antimalárica. Esse é o primeiro trabalho que descreve os polimorfismos existente nas regiões genéticas que codificam os domínios DBL e SPAM que caracterizam essas proteínas em isolados brasileiros.

A identificação dos polimorfismos foi realizada em 65 isolados provenientes de três cidades da Amazônia Brasileira: Mâncio Lima e Cruzeiro do Sul, no Acre, e Guajará no Amazonas. Essas áreas foram selecionadas pois estão entre as 10 cidades que concentram 70% da malária por *P. falciparum* no país. Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima são consideradas áreas de alta endemicidade de malária (IPA > 50) e Guajará é considerada área de média endemicidade (IPA >10 e < 50). Pelo fato de polimorfismos que ocorrem naturalmente em loci de candidatos vacinais serem determinantes críticos da eficácia de proteção das vacinas, é de suma importância investigar esses polimorfismos em isolados de campo.

A análise por PCR evidenciou a presença de apenas um fragmento para cada um dos domínios das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2, não sendo observados polimorfismos de tamanho nos fragmentos amplificados. Dos 65 isolados coletados, respectivamente, 45 e 43 foram amplificados com sucesso para as regiões SPAM e DBL da MSPDBL-1 e 49 e 33 foram amplificados com sucesso para as regiões SPAM e DBL da MSPDBL-2. A não amplificação bem-sucedida dos fragmentos de interesse em todos os isolados pode ser devido à presença de polimorfismos no sítio de

anelamento dos *primers* que impediria o anelamento correto e a posterior etapa de extensão do dna (124).

As MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são duas proteínas que exibem um dos maiores níveis de diversidade de sequência encontradas do genoma de *P. falciparum*, sendo a maioria desses polimorfismos localizados dentro seu domínio DBL (93). No nosso trabalho, a análise do sequenciamento mostrou um extenso polimorfismo no gene que codifica a MSPDBL-1, contrastando com uma relativa conservação do gene que codifica a MSPDBL-2. A análise das sequências do gene que codifica o domínio DBL da proteína MSPDBL-1 demonstrou diversidade, visto que todos os isolados sequenciados apresentaram polimorfismos de um único nucleotídeo. Descrevemos 40 polimorfismos em sítios nucleotídicos, gerando 34 substituições não sinônimas e 6 substituições sinônimas. Para a região do gene que codifica o domínio SPAM da MSPDBL-1, foram identificados 12 polimorfismos, resultando em 10 mutações não sinônimas e duas substituições sinônimas. Em contraste, para a MSPDBL-2, a região gênica que codifica o domínio SPAM, apresentou apenas três polimorfismos que resultaram em alteração de dois aminoácidos, enquanto na região gênica que codifica o domínio DBL foi observado apenas um polimorfismo resultando em mutação sinônima. A grande diversidade genética da MSPDBL-1 pode indicar que essa proteína esteja sob forte pressão seletiva para acumular mutações (93), fato consistente com a sua localização na superfície do parasito. Proteínas que se localizam na superfície do parasito são alvos da resposta imunológica do hospedeiro, logo a geração de diversidade atua como um mecanismo de evasão do parasito ao sistema imune (125). A relativa conservação do gene que codifica a MSPDBL-2 sugere a importância dessa região da proteína para o desenvolvimento e/ou viabilidade do parasito. No entanto em um trabalho que foi realizado., é importante ressaltar que o número de isolados sequenciados com sucesso para a MSPDBL-2 foi extremamente baixo, principalmente para o domínio DBL, tornando necessário o aumento do número de isolados sequenciados.

Embora estudos tenham mostrado que as MSPDBLs apresentam um papel importante na ligação do merozoítio com o eritrócito (84), sua função biológica ainda não foi completamente elucidada. Estudos recentes têm demonstrado que polimorfismos presentes nos genes *pfmspdbl1* e *pfmspdbl2* estão associados à resistência e/ou susceptibilidade às drogas antimaláricas. Polimorfismo no códon 591

(C591S) do gene *mispdbl2* está associado com aumento da resistência à halofantrina, mefloquina e lumefantrina (126,127). Diversos SNPs no gene *mispdbl1*, incluindo SNP no códon 359 observado nos 31 isolados sequenciados no nosso estudo, estão associados a resposta a cloroquina e lumefantrina (127–130). Estudos se fazem necessários para avaliar a associação entre polimorfismos nos genes que codificam as MSPDBL-1 e MSPDBL-2 e a susceptibilidade às drogas antimaláricas, visto que a identificação de marcadores moleculares e genes potencialmente associados à resistência aos antimaláricos são de importância em termos de vigilância epidemiológica.

A grande maioria dos polimorfismos observados nesse estudo se encontra no domínio DBL, enquanto o domínio SPAM aparentemente permaneceu mais conservado com apenas doze polimorfismos evidenciados na MSPDBL-1 e três na MSPDBL-2. Esses dados são corroborados pelo índice de diversidade genética, em que a diversidade nucleotídica foi alta (10^{-3}) para o domínio DBL da MSPDBL-1 e muitíssimo baixa para o mesmo domínio da MSPDBL-2. Esses dados da MSPDBL-2 discordam da literatura, em que esse domínio é retratado como polimórfico. Outras proteínas que fazem parte da família MSP-3 (MSP-3 e MSP-6) também possuem um domínio SPAM na sua região C-terminal e assim como observado nos isolados coletados nas áreas do nosso estudo, o domínio SPAM dessas proteínas apresenta alto nível de conservação nas suas sequências, que foi demonstrado elicitar anticorpos de reatividade cruzada que têm como alvo múltiplos membros da família MSP-3 (80,131). De forma contrária, o domínio DBL, que está presente também em membros da família EBL e EMP1 de *P. falciparum* (132) e na família de proteínas EBPs de *P. vivax* (133) apresenta natureza polimórfica em isolados de campo de diversos países do mundo. A diversidade genética dessas proteínas em áreas hiperendêmicas de malária tornam-se fator limitante na aquisição de imunidade protetora e assim desafiador na utilização de tais proteínas para o desenvolvimento de vacinas. A análise dos isolados do nosso estudo revelou um grande número de mutações não sinônimas dentro da região DBL da proteína MSPDBL-1, fato já observado anteriormente em trabalhos realizados com isolados africanos (84,85), sugerindo pressão do sistema imune nesse domínio ou de outras forças que atuam gerando diversidade genética.

A pequena distância entre as cidades de Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul e Guajará permitem grande fluxo de genes do genoma *P. falciparum* entre as populações, fator que associado a migração de pessoas, propicia a diversidade genética do parasito e favorece a difusão de cepas parasitárias (134), corroborando com essa informação não foi possível observar diferença no padrão de polimorfismos dos isolados das três localidades estudadas. Ao compararmos as sequências obtidas nos isolados que circulam em área endêmica brasileira com as sequências obtidas de isolados de diferentes regiões da África e da Ásia, foi possível observar alguns polimorfismos foram, até o momento, observados apenas nos isolados brasileiros. Entretanto, é importante ressaltar que 12 polimorfismos observados região genética que codifica o domínio DBL da MSPDBL-1 dos isolados brasileiros também foram identificados em isolados provenientes da Tailândia, Papua Nova-Guiné e Serra Leoa (84). Os polimorfismos descritos para o domínio SPAM da MSPDBL-2 nos isolados brasileiros não foram observados nos isolados de outras regiões geográficas. Alguns trabalhos realizados com isolados proveniente do Senegal (126), e no Kenya (127) descreveram a mutação C591S no domínio SPAM da MSPDBL-2 que está associada com resposta do parasito aos antimaláricos, como a lumefantrina. Não obstante, esse polimorfismo específico não foi observado nos isolados do presente estudo.

As populações de *P. falciparum* tanto na Amazônia Brasileira como em países do continente africano e asiático se estruturam de formas diferentes. Em um estudo realizado por Anderson et al. (1998) (135) utilizando dados de microssatélites em nove localidades diferentes (três do continente Africano, três da América do Sul e três da região do Pacífico/Ásia) foi identificado um espectro de estruturação populacional em que os países sul-americanos apresentaram menor diversidade genética que as três localidades africanas e altos níveis de variação geográfica entre as localidades da América do Sul. Machado et al. (2004) (136) também observou que de uma área para outra não há fluxo populacional e um grau de endocruzamento muito alto entre populações de *P. falciparum* na Amazônia Brasileira. A pouca distância entre as populações estudadas e a estruturação populacional do parasito nas áreas estudadas da Amazônia Brasileira podem influenciar no perfil de resistência a drogas e até mesmo no perfil de resposta imune, visto que pode nos ajudar a avaliar de que forma os polimorfismos encontrados no nosso estudo podem ser fixados ou modificados durante um período de tempo. Além do mais, a colonização e estruturação das regiões podem explicar o padrão diferenciado de polimorfismos observados na África e na

Amazônia Brasileira, visto que diversos polimorfismos foram descritos apenas no nosso estudo enquanto há polimorfismos presentes na África que não foram encontrados aqui.

Não há muitos estudos sobre essas as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2, logo devemos considerar a possibilidade de que os polimorfismos observados no presente estudo possam existir em outras áreas endêmicas de malária do mundo e até mesmo do Brasil, contudo, por diversas razões metodológicas ainda não foram descritas. Uma das limitações do nosso trabalho foi justamente a escassez de amostras de *P. falciparum*. No Brasil, os casos de malária são majoritariamente causados por *P. vivax*. Por mais que Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará sejam consideradas de alta e média endemicidade para *P. falciparum*, a casuística inicial no presente trabalho, 65 isolados, é baixa. Além da quantidade reduzida de isolados, a dificuldade na amplificação e sequenciamento com os primers desenhados para esse trabalho, representa um fator limitante do estudo.

Em áreas de alta endemicidade de malária, os indivíduos podem ser infectados simultaneamente com mais clones do parasito, o que tem sido chamadas de infecções multiclonais e policlonais (137,138). Essas infecções multiclonais têm sido evidenciadas tanto por análise de amplificação gênica por PCR (polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado), quanto por análise de sequenciamento. No nosso trabalho não foram observados polimorfismos de tamanho em relação aos fragmentos amplificados para os domínios SPAM e DBL das MSPDBL-1 e MSPDBL-2. Esse dado também foi confirmado por análise de sequenciamento que evidenciou, em cada um dos isolados, a presença de apenas uma sequência para cada uma das regiões gênicas que codificam MSPDBL-1 e MSPDBL-2.

Genes de *P. falciparum* que codificam para proteínas que são reconhecidas por anticorpos presentes no soro humano estão sob forte pressão seletiva para acumular mutações (139). Partindo dessa premissa e pelo fato que as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são amplamente reconhecidas por anticorpos presentes no soro de indivíduos residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária, avaliamos a possibilidade dos genes que codificam as MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estarem sofrendo pressão seletiva. Além da pressão seletiva outras forças como deriva genética, mutação, endocruzamento, recombinação, efeitos gargalos e isolamento por

distância atuam no aumento e/ou redução da variabilidade genética de uma população. Em um estudo realizado em 5 municípios do estado do Acre e Pará, em áreas muito próximas a nossa área de estudo foi possível observar que não havia cruzamento entre as localidades estudadas contudo havia alto grau de endocruzamento. Essas populações estudadas também não apresentavam evidências de severo efeito gargalo (136). Não observamos diferenças no padrão de polimorfismo entre as três localidades estudadas, fato que está em concordância com estudos prévios na região amazônica em que não foi possível observar isolamento por distância (136,140) ou grande diferença entre populações com pouca distância entre si.

A análise dos genes *pfmspdbl1* e *pfmspdbl2* evidenciou uma gama de mutações que contribuíram para a geração de variabilidade haplotípica e nucleotídica. Essa variedade haplotípica e nucleotídica é uma das formas do parasito de evadir o sistema imune do hospedeiro, através da acumulação de mutações não-sinônimas, que irão acarretar variação adaptativa, mantida pela seleção balanceadora (93). O propósito do teste D de Tajima é identificar o desvio de neutralidade, ou seja, indicar processos como seleção balanceadora, expansão populacional e varreduras seletivas. Valores positivos para o teste D de Tajima (TDT) são indicativos de seleção balanceadora na população enquanto valores negativos são indicativos de seleção purificadora (109). Em outros estudos que consideraram outras populações na África (93), as duas proteínas mostraram valores excepcionalmente altos no teste de Tajima, sugerindo que elas estão sob seleção balanceadora. Entretanto, em nosso estudo, na análise genética da população comparando os dois domínios separados e os dois domínios juntos o domínio DBL da MSPDBL-1 e da MSPDBL-2 foi o único que apresentou valor positivo para o TDT, contudo não observamos valores estatisticamente significantes, indicando de que não há seleção significativa nos domínios dos genes *pfmspdbl1* e *pfmspdbl-2*.

Polimorfismos em muitos antígenos são causados por variações na sequência de repetições em tandem, que é característica de muitos antígenos plasmodiais e que, frequentemente, constituem regiões imunodominantes da molécula (141). Entretanto, mutações de ponto também têm sido descritas em vários antígenos com ou sem sequências repetitivas (142). Polimorfismos genéticos em regiões que codifiquem epítopos imunodominantes podem alterar o escore de reconhecimento dos epítopos

de células B e T, ou até mesmo interromper completamente a resposta imune, sendo um ponto crucial no desenvolvimento de uma vacina antimalárica pelo potencial de geração de mecanismos de escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro (80,143). Assim, nosso trabalho também avaliou a predição *in silico*, de epítomos de células T e B imunodominantes das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2, considerando a sequência referência 3D7, e avaliou o possível impacto de mutações de base única na predição desses epítomos.

Inicialmente, com base na sequência completa das MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram preditos 15 epítomos lineares de células B (8 da MSPDBL-1 e 7 da MSPDBL-2). A variação de aminoácidos nas regiões potencialmente antigênicas de células B foi observado apenas na MSPDBL-1, sendo mais um indício de que essa proteína está sob pressão seletiva do sistema imune. A maioria das mutações não sinônimas não resultou em grande alteração no potencial dos epítomos preditos. Contudo, as mutações A175T e L187P quando ocorrem juntas, causam a drástica diminuição do escore do epítomo, excluindo-o de ser potencial epítomo. Curiosamente, duas mutações (L525R e D508E) aumentam o escore de predição. Mutações que ocorrem dentro dos possíveis epítomos de células B podem influenciar e modificar no reconhecimento desses epítomos, sendo justamente um mecanismo de evasão por variação antigênica, evitando o reconhecimento por anticorpos (144). Além dos epítomos de células B, a partir da sequência referência 3D7 também foram identificados 14 epítomos de células T (9 para MSPDBL-1 e 5 para a MSPDBL-2), os quais são reconhecidos pelas moléculas dos antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade com frequência que variou entre 50 e 82%, e a pontuação consenso menor que 20. Sete mutação não sinônimas estavam localizadas nesses epítomos de células T, salientando a capacidade do parasito de gerar mutações randômicas que podem ou não favorecer a diversidade em regiões epitópicas envolvidas na proteção (80). Embora estudos tenham demonstrado que polimorfismos presentes em epítomos preditos não alteram os escores de antigenicidade do epítomo (145,146), outros estudos têm relatado que substituições de aminoácidos (SNPs), podem acarretar a redução da afinidade de ligação até a perda de propensão de ligação (147,148). Em nosso trabalho, foi possível observar como tais alterações de aminoácidos podem alterar o escore do epítomo, assim como mutações que não causam grandes alterações no potencial epítomo predito.

Em conjunto, nossos dados mostraram que os isolados de *Plasmodium falciparum* que circulam em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará apresentam uma extensiva diversidade genética embora a região gênica que codifica a MSPDBL-1 apresente uma maior diversidade genética quando comparada a MSPDBL-2 e que polimorfismos de única base que acarretam mutações não sinônimas podem impactar os epítomos T e B imunodominantes das MSPDBL-1 e MSPDBL-2, influenciando no desenvolvimento de uma resposta imune específica. Nossos dados ressaltam a importância das MSPs como candidatas vacinais, entretanto, avaliar polimorfismos genéticos, mesmo que limitados, em regiões que codifiquem epítomos imunodominantes, é um ponto crucial no desenvolvimento de uma vacina antimalárica pelo potencial de geração de mecanismos de escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro.

6 CONCLUSÕES

Nossos estudos mostraram que:

- Os isolados de *Plasmodium falciparum* que circulam em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará apresentam uma extensiva diversidade genética.
- A região gênica que codifica a MSPDBL-1 apresenta uma maior diversidade genética quando comparada a MSPDBL-2, principalmente na região gênica que codifica o domínio DBL.
- Análise de predição *in silico* de epítomos B e T imunodominantes, considerando a sequência referência 3D7, evidenciaram 14 epítomos de células B e 14 epítomos de células T que são reconhecidos com frequência de 50 a 82 % dos Antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas pretendemos:

- Avaliar e validar o perfil diferencial da resposta imune contra os epítomos B e T mutados preditos *in silico*.
- Desenhar novos primers para amplificar as regiões gênicas que codificam os domínios SPAM e DBL da MSPDBL-1 e da MSPDBL-2 dos isolados que não foram amplificados e/ou sequenciados.
- Aumentar o número de isolados coletados em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará.
- Avaliar o polimorfismo da região gênica que codifica as MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em outras áreas endêmicas brasileiras de malária.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faust C, Dobson AP. Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic Plasmodium. One Heal [Internet]. 2015/10/24. 2015;66–75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28616467>
2. Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, et al. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Cell. 2004/03/10. 2004;116(5):661–70.
3. Consoli RAGB L-OR. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1994. 228 p.
4. Mirabello L, Conn JE. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Hered. 2006/03/02. 2006;96(4):311–21.
5. Consoli RAGB, Oliveira RL de. Mosquitos de importância sanitária do Brasil.pdf. 1994. 228 p.
6. Gomes ECS, Cruz DLD, Santos M, Souza RMC, Oliveira CMF, Ayres CFJ, et al. Outbreak of autochthonous cases of malaria in coastal regions of Northeast Brazil: the diversity and spatial distribution of species of *Anopheles*. Parasit Vectors. 2020/12/16. 2020;13(1):621.
7. WHO. World Malaria Report [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>
8. Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. Lancet. 2018/04/11. 2018;391(10130):1608–21.
9. Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. Infez Med. 2016/07/02. 2016;24(2):93–104.
10. Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. J Vector Borne Dis. 2018/06/20. 2018;55(1):1–8.
11. Escalante AA, Pacheco MA. Malaria Molecular Epidemiology: An Evolutionary Genetics Perspective. Microbiol Spectr. 2019/08/11. 2019;7(4).
12. Price RN, Commons RJ, Battle KE, Thriemer K, Mendis K. *Plasmodium vivax* in the Era of the Shrinking *P. falciparum* Map. Trends Parasitol. 2020 Jun;36(6):560–70.

13. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim. Brasília; 2020.
14. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016 May;15(1):284.
15. Pribluda VS, Evans L, Barillas E, Marmion J, Lukulay P, Chang J. Were medicine quality and pharmaceutical management contributing factors in diminishing artemisinin efficacy in Guyana and Suriname? *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):77. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-77>
16. Acharya P, Garg M, Kumar P, Munjal A, Raja KD. Host-Parasite Interactions in Human Malaria: Clinical Implications of Basic Research. *Front Microbiol*. 2017;8:889.
17. Thera MA, Plowe C V. Vaccines for malaria: how close are we? *Annu Rev Med*. 2012;63:345–57.
18. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):220–4.
19. Frischknecht F, Matuschewski K. Plasmodium Sporozoite Biology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 May;7(5).
20. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends Parasitol*. 2015 Aug;31(8):357–62.
21. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010 Oct 26;107(43):18640 LP – 18645. Available from: <http://www.pnas.org/content/107/43/18640.abstract>
22. Voza T, Miller JL, Kappe SHI, Sinnis P. Extrahepatic exoerythrocytic forms of rodent malaria parasites at the site of inoculation: clearance after immunization, susceptibility to primaquine, and contribution to blood-stage infection. *Infect Immun*. 2012 Jun;80(6):2158–64.
23. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz J-F, et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe*. 2008 Feb;3(2):88–96.
24. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001 Jan;291(5501):141–4.
25. Mota MM, Giordano S, Rodriguez A. Targeting Plasmodium host cells: survival within hepatocytes. *Trends Mol Med*. 2004 Oct;10(10):487–92.

26. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016 Oct;167(3):610–24.
27. Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Oct;11(10):701–12.
28. Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res*. 2011 Jan;108(1):247–52.
29. Gomes PS, Bhardwaj J, Rivera-Correa J, Freire-De-Lima CG, Morrot A. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Front Microbiol*. 2016;7:1617.
30. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham W-H, Duraisingh MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host Microbe*. 2017 Aug;22(2):232–45.
31. Ouattara A, Laurens MB. Vaccines against malaria. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2015 Mar;60(6):930–6.
32. Meibalan E, Marti M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Mar;7(3).
33. Singh M, Suryanshu, Kanika, Singh G, Dubey A, Chaitanya RK. Plasmodium's journey through the Anopheles mosquito: A comprehensive review. *Biochimie*. 2021 Feb;181:176–90.
34. de Jong RM, Tebeje SK, Meerstein-Kessel L, Tadesse FG, Jore MM, Stone W, et al. Immunity against sexual stage Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasites. *Immunol Rev*. 2020 Jan;293(1):190–215.
35. Laurens MB. The Promise of a Malaria Vaccine-Are We Closer? *Annu Rev Microbiol*. 2018 Sep;72:273–92.
36. Palacpac NMQ, Horii T. Malaria vaccines: facing unknowns. *F1000Research*. 2020;9.
37. Strassburg MA. The global eradication of smallpox. *Am J Infect Control*. 1982 May;10(2):53–9.
38. Mustapha MM, Harrison LH. Vaccine prevention of meningococcal disease in Africa: Major advances, remaining challenges. *Hum Vaccin Immunother*. 2018 May;14(5):1107–15.
39. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest*. 2010 Dec;120(12):4168–78.
40. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. *Am J Prev Med*. 2015 Dec;49(6 Suppl 4):S319-33.

41. Miles A, Iqbal Z, Vauterin P, Pearson R, Campino S, Theron M, et al. Indels, structural variation, and recombination drive genomic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Genome Res.* 2016 Sep;26(9):1288–99.
42. Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev.* 2004 Oct;201:268–90.
43. COHEN S, McGREGOR IA, CARRINGTON S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 1961 Nov;192:733–7.
44. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Sep;45(3):297–308.
45. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJF, van Gemert GJ, et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med.* 2009 Jul;361(5):468–77.
46. Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *plasmodium berghei*. *Nature.* 1967 Oct;216(5111):160–2.
47. Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bull World Health Organ.* 1979;57 Suppl 1(Suppl):165–73.
48. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):13–36, Table of Contents.
49. Rodriguez-Barraquer I, Arinaitwe E, Jagannathan P, Kanya MR, Rosenthal PJ, Rek J, et al. Quantification of anti-parasite and anti-disease immunity to malaria as a function of age and exposure. *Elife.* 2018 Jul;7.
50. Rodriguez-Barraquer I, Arinaitwe E, Jagannathan P, Boyle MJ, Tappero J, Muhindo M, et al. Quantifying Heterogeneous Malaria Exposure and Clinical Protection in a Cohort of Ugandan Children. *J Infect Dis.* 2016 Oct;214(7):1072–80.
51. Frimpong A, Kusi KA, Ofori MF, Ndifon W. Novel Strategies for Malaria Vaccine Design. *Front Immunol.* 2018;9:2769.
52. Chattopadhyay R, Kumar S. Malaria vaccine: latest update and challenges ahead. *Indian J Exp Biol.* 2009 Jul;47(7):527–36.
53. Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum Vaccin*

- Immunother. 2020 Mar;16(3):480–9.
54. Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner DGJ, Hall T, et al. A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults. *Vaccine*. 2007 Jul;25(29):5359–66.
 55. Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, Ockenhouse CF, Krzych U, Moris P, et al. Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis*. 2009 Aug;200(3):337–46.
 56. Kester KE, Cummings JF, Ockenhouse CF, Nielsen R, Hall BT, Gordon DM, et al. Phase 2a trial of 0, 1, and 3 month and 0, 7, and 28 day immunization schedules of malaria vaccine RTS,S/AS02 in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*. 2008 Apr;26(18):2191–202.
 57. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, et al. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet (London, England)*. 2001 Dec;358(9297):1927–34.
 58. Lyke KE. Steady progress toward a malaria vaccine. *Curr Opin Infect Dis*. 2017 Oct;30(5):463–70.
 59. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2015 Jul;386(9988):31–45.
 60. Bliss CM, Drammeh A, Bowyer G, Sanou GS, Jagne YJ, Ouedraogo O, et al. Viral Vector Malaria Vaccines Induce High-Level T Cell and Antibody Responses in West African Children and Infants. *Mol Ther*. 2017 Feb;25(2):547–59.
 61. Datto MS, Natama MH, Somé A, Traoré O, Rouamba T, Bellamy D, et al. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2021 May;
 62. Miura K. Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2016 Jun;15(6):765–81.
 63. Roestenberg M, Remarque E, de Jonge E, Hermsen R, Blythman H, Leroy O, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1

- malaria vaccine adjuvanted with Alhydrogel, Montanide ISA 720 or AS02. *PLoS One*. 2008;3(12):e3960.
64. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Ouattara A, Kone AK, et al. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N Engl J Med*. 2011 Sep;365(11):1004–13.
 65. Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol*. 2002 Oct;56(4):327–43.
 66. Zheng J, Pan H, Gu Y, Zuo X, Ran N, Yuan Y, et al. Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. *Biomed Res Int*. 2019;2019:9751471.
 67. Coelho CH, Rappuoli R, Hotez PJ, Duffy PE. Transmission-Blocking Vaccines for Malaria: Time to Talk about Vaccine Introduction. *Trends Parasitol*. 2019 Jul;35(7):483–6.
 68. INSTITUTO OSWALDO CRUZ Mestrado em Biologia Celular e Molecular Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2 . 6c e seus componentes , Proteína 3 da Superfície do Merozoíto (MSP-3), Proteína Rica em Glutamato populações expo. Vol. 45. 2017.
 69. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006 Feb;124(4):755–66.
 70. Osier FH, Mackinnon MJ, Crosnier C, Fegan G, Kamuyu G, Wanaguru M, et al. New antigens for a multicomponent blood-stage malaria vaccine. *Sci Transl Med*. 2014 Jul;6(247):247ra102.
 71. Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Healer J, Hodder AN, Fowkes FJI, et al. Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. *J Immunol*. 2013 Jul;191(2):795–809.
 72. Lin CS, Uboldi AD, Marapana D, Czabotar PE, Epp C, Bujard H, et al. The merozoite surface protein 1 complex is a platform for binding to human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2014 Sep;289(37):25655–69.
 73. Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, et al. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 3:37–42.
 74. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single

- fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990 Jul;172(1):379–82.
75. Goel VK, Li X, Chen H, Liu S-C, Chishti AH, Oh SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr;100(9):5164–9.
 76. Tarazona-Santos E, Castilho L, Amaral DRT, Costa DC, Furlani NG, Zuccherato LW, et al. Population genetics of GYPB and association study between GYPB*S/s polymorphism and susceptibility to *P. falciparum* infection in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2011 Jan;6(1):e16123.
 77. Lopez-Perez M, Villasis E, Machado RLD, Póvoa MM, Vinetz JM, Blair S, et al. *Plasmodium falciparum* field isolates from South America use an atypical red blood cell invasion pathway associated with invasion ligand polymorphisms. *PLoS One*. 2012;7(10):e47913.
 78. Baldwin MR, Li X, Hanada T, Liu S-C, Chishti AH. Merozoite surface protein 1 recognition of host glycophorin A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. *Blood*. 2015 Apr;125(17):2704–11.
 79. McColl DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Mol Biochem Parasitol*. 1997 Dec;90(1):21–31.
 80. Singh S, Soe S, Weisman S, Barnwell JW, Pérignon JL, Druilhe P. A conserved multi-gene family induces cross-reactive antibodies effective in defense against *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2009;4(4):e5410.
 81. Batchelor JD, Zahm JA, Tolia NH. Dimerization of *Plasmodium vivax* DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Jul;18(8):908–14.
 82. Maier AG, Baum J, Smith B, Conway DJ, Cowman AF. Polymorphisms in erythrocyte binding antigens 140 and 181 affect function and binding but not receptor specificity in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2009 Apr;77(4):1689–99.
 83. Tolia NH, Enemark EJ, Sim BKL, Joshua-Tor L. Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*. 2005 Jul;122(2):183–93.
 84. Wickramarachchi T, Cabrera AL, Sinha D, Dhawan S, Chandran T, Devi YS, et al. A novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein associated with

- the merozoite surface, PfDBLMSP. *Int J Parasitol.* 2009 Jun;39(7):763–73.
85. Hodder AN, Czabotar PE, Uboldi AD, Clarke OB, Lin CS, Healer J, et al. Insights into Duffy binding-like domains through the crystal structure and function of the merozoite surface protein MSPDBL2 from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2012 Sep;287(39):32922–39.
 86. Chiu CYH, Hodder AN, Lin CS, Hill DL, Li Wai Suen CSN, Schofield L, et al. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* Proteins MSPDBL1 and MSPDBL2 Opsonize Merozoites, Inhibit Parasite Growth, and Predict Protection From Clinical Malaria. *J Infect Dis.* 2015 Aug;212(3):406–15.
 87. Lin CS, Uboldi AD, Epp C, Bujard H, Tsuboi T, Czabotar PE, et al. Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes. *J Biol Chem.* 2016 Apr;291(14):7703–15.
 88. Van Tyne D, Park DJ, Schaffner SF, Neafsey DE, Angelino E, Cortese JF, et al. Identification and functional validation of the novel antimalarial resistance locus PF10_0355 in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Genet.* 2011 Apr;7(4):e1001383.
 89. Amambua-Ngwa A, Tetteh KKA, Manske M, Gomez-Escobar N, Stewart LB, Deerhake ME, et al. Population genomic scan for candidate signatures of balancing selection to guide antigen characterization in malaria parasites. *PLoS Genet.* 2012;8(11):e1002992.
 90. Weedall GD, Conway DJ. Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity. *Trends Parasitol.* 2010 Jul;26(7):363–9.
 91. Burgess BR, Schuck P, Garboczi DN. Dissection of merozoite surface protein 3, a representative of a family of *Plasmodium falciparum* surface proteins, reveals an oligomeric and highly elongated molecule. *J Biol Chem.* 2005 Nov;280(44):37236–45.
 92. Tetteh KKA, Stewart LB, Ochola LI, Amambua-Ngwa A, Thomas AW, Marsh K, et al. Prospective identification of malaria parasite genes under balancing selection. *PLoS One.* 2009;4(5):e5568.
 93. Ochola LI, Tetteh KKA, Stewart LB, Riitho V, Marsh K, Conway DJ. Allele frequency-based and polymorphism-versus-divergence indices of balancing selection in a new filtered set of polymorphic genes in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol.* 2010 Oct;27(10):2344–51.
 94. Tetteh KKA, Osier FHA, Salanti A, Kamuyu G, Drought L, Faily M, et al. Analysis of antibodies to newly described *Plasmodium falciparum* merozoite antigens

- supports MSPDBL2 as a predicted target of naturally acquired immunity. *Infect Immun.* 2013 Oct;81(10):3835–42.
95. Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. *Vaccine.* 2012 Mar;30(11):1972–80.
 96. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018 May;18(5):325–39.
 97. Lima-Junior J da C, Pratt-Riccio LR. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. *Front Immunol.* 2016;7:13.
 98. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:301–23.
 99. Enciso-Mora V, Broderick P, Ma Y, Jarrett RF, Hjalgrim H, Hemminki K, et al. A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21 and 10p14 (GATA3). *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1126–30.
 100. Hill A V, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, et al. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature.* 1991 Aug;352(6336):595–600.
 101. Verra F, Mangano VD, Modiano D. Genetics of susceptibility to *Plasmodium falciparum*: from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies. *Parasite Immunol.* 2009 May;31(5):234–53.
 102. Matos A da S, Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Baptista B de O, de Souza RM, Bitencourt-Chaves L, et al. Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals From the Brazilian Amazon. *Front Immunol.* 2019;10:2230.
 103. Bitencourt Chaves L, Perce-da-Silva D de S, Rodrigues-da-Silva RN, Martins da Silva JH, Cassiano GC, Machado RLD, et al. *Plasmodium vivax* Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (PvCeITOS) gene sequence and potential epitopes are highly conserved among isolates from different regions of Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Feb;11(2):e0005344.
 104. Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Lopez-Camacho C, Martins da Silva JH, Perce-da-Silva D de S, Têva A, et al. *Plasmodium vivax* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites: Naturally Acquired Humoral Immune Response and B-Cell Epitope Mapping in Brazilian Amazon Inhabitants. *Front Immunol.*

- 2017;8:77.
105. Projetos SC, Relatórios P. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM. 2003.
 106. BRASIL. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2 ed. Saúde M da, editor. Vol. 1. Brasília: Secretária de Vigilância em Saúde; 2009. p. 116 p.
 107. Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol Biol* [Internet]. 1996/01/01. 1996;50:263–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8751365>
 108. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol*. 2017 Dec;34(12):3299–302.
 109. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989 Nov;123(3):585–95.
 110. Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, Pei J, et al. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins*. 2009;77 Suppl 9(0 9):89–99.
 111. Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul;32(Web Server issue):W526-31.
 112. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci*. 2018 Jan;27(1):293–315.
 113. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit*. 2008;21(4):243–55.
 114. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci*. 2003 May;12(5):1007–17.
 115. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jul;36(Web Server issue):W509-12.
 116. Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics*. 2005 May;6:132.
 117. Sidney J, Assarsson E, Moore C, Ngo S, Pinilla C, Sette A, et al. Quantitative

- peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome Res.* 2008 Jan;4:2.
118. Richards JS, Beeson JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol.* 2009 Jul;87(5):377–90.
 119. Soulama I, Bigoga JD, Ndiaye M, Bougouma EC, Quagraine J, Casimiro PN, et al. Genetic diversity of polymorphic vaccine candidate antigens (apical membrane antigen-1, merozoite surface protein-3, and erythrocyte binding antigen-175) in *Plasmodium falciparum* isolates from western and central Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Feb;84(2):276–84.
 120. Neafsey DE, Juraska M, Bedford T, Benkeser D, Valim C, Griggs A, et al. Genetic Diversity and Protective Efficacy of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine. *N Engl J Med.* 2015 Nov;373(21):2025–37.
 121. Zeeshan M, Alam MT, Vinayak S, Bora H, Tyagi RK, Alam MS, et al. Genetic variation in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in India and its relevance to RTS,S malaria vaccine. *PLoS One.* 2012;7(8):e43430.
 122. Mu J, Awadalla P, Duan J, McGee KM, Keebler J, Seydel K, et al. Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):126–30.
 123. Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DAJ, et al. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):113–9.
 124. Wang K, Li H, Xu Y, Shao Q, Yi J, Wang R, et al. MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul;47(W1):W610–3.
 125. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJ, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2016/02/03. 2016;40(3):343–72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26833236>
 126. Van Tyne D, Uboldi AD, Healer J, Cowman AF, Wirth DF. Modulation of PF10_0355 (MSPDBL2) alters *Plasmodium falciparum* response to antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul;57(7):2937–41.
 127. Ochola-Oyier LI, Okombo J, Mwai L, Kiara SM, Pole L, Tetteh KKA, et al. The MSPDBL2 codon 591 polymorphism is associated with lumefantrine in vitro drug responses in *Plasmodium falciparum* isolates from Kilifi, Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Mar;59(3):1770–5.

128. Sisowath C, Petersen I, Veiga MI, Mårtensson A, Premji Z, Björkman A, et al. In vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible *pfprt* K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa. *J Infect Dis.* 2009 Mar;199(5):750–7.
129. Price RN, Uhlemann A-C, van Vugt M, Brockman A, Hutagalung R, Nair S, et al. Molecular and pharmacological determinants of the therapeutic response to artemether-lumefantrine in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2006 Jun;42(11):1570–7.
130. Pradines B, Tall A, Fusai T, Spiegel A, Hienne R, Rogier C, et al. In vitro activities of benflumetol against 158 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Feb;43(2):418–20.
131. Demanga CG, Daher L-J, Prieur E, Blanc C, Pérignon J-L, Bouharoun-Tayoun H, et al. Toward the rational design of a malaria vaccine construct using the MSP3 family as an example: contribution of antigenicity studies in humans. *Infect Immun.* 2010 Jan;78(1):486–94.
132. Howell DP-G, Samudrala R, Smith JD. Disguising itself--insights into *Plasmodium falciparum* binding and immune evasion from the DBL crystal structure. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Jul;148(1):1–9.
133. Mittal P, Mishra S, Kar S, Pande V, Sinha A, Sharma A. Global distribution of single amino acid polymorphisms in *Plasmodium vivax* Duffy-binding-like domain and implications for vaccine development efforts. *Open Biol.* 2020 Sep;10(9):200180.
134. Nabet C, Doumbo S, Jeddi F, Konaté S, Manciuilli T, Fofana B, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in human malaria cases in Mali. *Malar J.* 2016 Jul;15:353.
135. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol.* 2000 Oct;17(10):1467–82.
136. Machado RLD, Povoá MM, Calvosa VSP, Ferreira MU, Rossit ARB, dos Santos EJM, et al. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. *J Infect Dis.* 2004 Nov;190(9):1547–55.
137. Bendixen M, Msangeni HA, Pedersen B V, Shayo D, Bødker R. Diversity of *Plasmodium falciparum* populations and complexity of infections in relation to

- transmission intensity and host age: a study from the Usambara Mountains, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(2):143–8.
138. Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT, et al. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* 1987 Jun;236(4809):1661–6.
 139. Escalante AA, Lal AA, Ayala FJ. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics.* 1998 May;149(1):189–202.
 140. Griffing SM, Viana GMR, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, de Oliveira AM, et al. Historical shifts in Brazilian *P. falciparum* population structure and drug resistance alleles. *PLoS One.* 2013;8(3):e58984.
 141. Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DJ, Anders RF. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990 Mar;39(2):227–34.
 142. Bolad A, Berzins K. Antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* and antibody-mediated parasite neutralization. *Scand J Immunol.* 2000 Sep;52(3):233–9.
 143. Tanabe K, Escalante A, Sakihama N, Honda M, Arisue N, Horii T, et al. Recent independent evolution of *msh1* polymorphism in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 2007 Nov;156(1):74–9.
 144. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:445–70.
 145. Kuamsab N, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Polymorphism and natural selection in the merozoite surface protein 3F2 (*PVX_97710*) locus of *Plasmodium vivax* among field isolates. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2020 Mar;78:104058.
 146. Chaves LB, Perce-da-Silva D de S, Totino PRR, Riccio EKP, Baptista B de O, de Souza ABL, et al. *Plasmodium vivax* ookinete surface protein (*Pvs25*) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2019 Sep;73:287–94.
 147. Ju H-L, Kang J-M, Moon S-U, Kim J-Y, Lee H-W, Lin K, et al. Genetic polymorphism and natural selection of Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* Myanmar isolates. *Malar J.* 2012 Mar;11:60.
 148. Lin L-Y, Huang H-Y, Liang X-Y, Xie D-D, Chen J-T, Wei H-G, et al. Genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein

(TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* on Bioko Island, Equatorial Guinea and global comparative analysis. *Malar J.* 2021 Mar;20(1):124.

9 ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: LILIAN ROSE PRATT RICCIO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 46084015.1.0000.5248

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-RJ

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.420.846

Apresentação do Projeto:

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

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

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cep@ioc.fiocruz.br

Continuação do Projeto: 1.420.846

última linha de tratamento, e inseticidas disponíveis atualmente

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

Os antígenos GLURP (Proteína Rica em Glutamato), MSP3 (Proteína de Superfície de Merozoíto-3) e Pfs48/45 (Antígeno Pré-fertilização Pfs48/45) de *Plasmodium falciparum* são candidatos à vacina antimalárica, selecionados a partir de um racional comumente utilizado para candidatos vacinais, como a correlação dos títulos de anticorpos específicos com os diversos graus de proteção clínica de indivíduos vivendo em área endêmica. A candidata vacinal GMZ2 é uma proteína de recombinante que contém fragmentos conservados de GLURP e MSP3. Ensaios clínicos mostraram que a GMZ2 é bem tolerada, segura e imunogênica e que anticorpos induzidos após a imunização com GMZ2 foram específicos e funcionais, capazes de controlar o crescimento *in vitro* do *P. falciparum*. Além disso, foram demonstrados alta prevalência e títulos de anticorpos naturalmente adquiridos contra a GMZ2 em indivíduos residentes em área de alta endemicidade de malária na África. Importa, entretanto, verificar se o mesmo potencial é apresentado pelas populações-alvo no Brasil. Assim, pretendemos avaliar o perfil das respostas imune celular e humoral contra uma nova recombinante, GMZ2.6c, e seus componentes (MSP3, GLURP e Pfs48/45) e sua relação com o grau de imunidade antiparasitária em indivíduos cronicamente expostos à malária residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira com alto e médio risco de transmissão. O estudo será concentrado nas cidades de Mâncio Lima (AC) e Guajará (AM). Também serão coletadas amostras de indivíduos que forem procurar assistência médica ou tratamento no Instituto Evandro Chagas (IEC) em Ananindeua (PA) e na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV) em Manaus (AM). Serão utilizadas proteínas recombinantes correspondentes à região C-terminal da MSP3 e às regiões N- e C-terminal da GLURP. Para mapeamento epitópico serão utilizados peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes regiões da MSP3 e da GLURP. A avaliação da resposta imune humoral será feita pela técnica de ELISA. A resposta imune celular será avaliada por citometria de fluxo e o

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

Continuação do Parecer: 1.420.846

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

Critério de Inclusão:

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

Critério de Exclusão:

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

Plano amostral:

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

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

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

Centros Coparticipantes:

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

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

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

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



Continuação do Parecer: 1.420.846

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

Objetivo Secundário:

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

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

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

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

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cep@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.848

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

1) PROJETO:

a) Delineamento do estudo:

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

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

Pendência atendida.

b) Metodologia:

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

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



Continuação do Parecer: 1.433.846

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

Pendência atendida.

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

Pendência atendida.

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

Pendência atendida.

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

Pendência atendida.

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

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



Continuação do Parecer: 1.420.848

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

Pendência atendida.

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

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

Pendência atendida.

c) Dos riscos e benefícios

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

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

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

Pendência atendida.

2 e 3) TCLE e TALE.

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

Pendência atendida.

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

Continuação do Parecer: 1.420.848

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

Pendência atendida.

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

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

Pendência atendida.

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

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

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

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

Pendência atendida.

5) DECLARAÇÃO DAS INSTITUIÇÕES

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

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

Continuação do Parecer: 1.420.846

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

As declarações foram incluídas.

Pendência atendida.

7) ACORDO ENTRE AS INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

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

Os acordos entre as instituições foram reescritos e anexados.

Pendência atendida.

8) DECLARAÇÃO

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

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

Pendência atendida.

9) CRONOGRAMA

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

O cronograma foi corrigido.

Pendência atendida.

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



Continuação do Parecer: 1.420.846

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto Folha de Rosto.pdf

TCLE / Termos de Assentimento / ANEXOIIIITALE.docx

TCLE / Termos de Assentimento / ANEXOIIITCLEcontroles.docx

TCLE / Termos de Assentimento/ ANEXOITCLEmalaria.docx

Carta resposta.docx

ANEXO V quest.docx

ANEXO IV decoord.docx

BIORREPOSITÓRIO.docx

Orçamento Orcamento.docx

Declaração de Instituição e Infraestrutura AnuenciaUSP.pdf

Declaração de Pesquisadores CartaMarcusLacerda_Lilian.pdf

Declaração de Pesquisadores AcordoMVGL.pdf

Declaração de Pesquisadores DeclaracaoMUF.pdf

Declaração de Pesquisadores ACORDOMUF.pdf

Declaração de Pesquisadores AcordoRLDM.pdf

Declaração de Pesquisadores AnuencialFMTAM.pdf

Declaração de Pesquisadores DeccompMVGL.pdf

Declaração de Pesquisadores DeccompRLDM.pdf

Projeto Detalhado /Brochura Investigador PROJETO.doc

Recomendações:

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

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-0011

Fax: (21)2581-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

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



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.420.846

Outros	BIORREPOSITORIO.docx	26/08/2015 19:00:20	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	11/06/2015 12:11:42		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

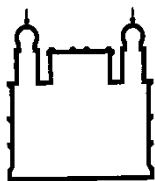
RIO DE JANEIRO, 23 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

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

Página 12 de 12

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



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



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – MALÁRIA

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

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

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

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do polimorfismo genético das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *Plasmodium falciparum* e o seu impacto nos epítomos B e T imunodominantes

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

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

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

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

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

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

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

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

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

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

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

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

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

A sua participação será sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer despesa e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Os gastos necessários para a participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantido um pagamento em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa. O material coletado para realização dos exames será devidamente acondicionado em nitrogênio líquido ou freezer -70°C e ficará sob a guarda da coordenadora

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

do projeto, no Laboratório de Pesquisas em Malária – Fiocruz/RJ pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados.

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

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

Data: _____
Assinatura do Pesquisador

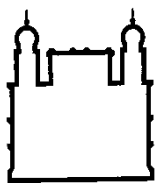
Data: _____
Assinatura Testemunha

Data: _____
Assinatura do voluntário



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

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



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



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

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

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

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do polimorfismo genético das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *Plasmodium falciparum* e o seu impacto nos epítomos B e T imunodominantes

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

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

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

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

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

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

Para diagnosticar malária, a retirada do seu sangue poderá ser feita na veia do antebraço ou no dedo, por um médico, farmacêutico ou biólogo membro da equipe da pesquisa. A coleta

Rubrica do responsável do voluntário

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

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

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

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

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

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

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

Rubrica do responsável do voluntário

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

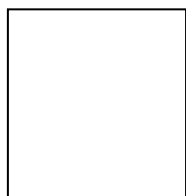
Eu, _____ fui informado sobre o projeto de maneira clara e tendo o consentimento já assinado pelo meu pai/responsável, declaro que concordo participar desta pesquisa. Consinto que os procedimentos de coleta acima descritos sejam realizados em minha pessoa e autorizo o depósito, armazenamento e utilização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

_____ Data: _____
Assinatura do Pesquisador

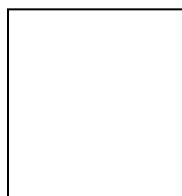
_____ Data: _____
Assinatura Testemunha

_____ Data: _____
Assinatura Responsável

_____ Data: _____
Assinatura do menor voluntário

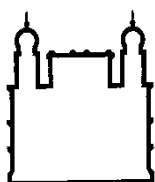


Em caso de impossibilidade de o responsável assinar inserir impressão digital



Em caso de impossibilidade de o menor assinar inserir impressão digital

ANEXO IV - QUESTIONÁRIO



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



REGISTRO N°

Data:

PROJETO: Avaliação do polimorfismo genético das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *Plasmodium falciparum* e o seu impacto nos epítomos B e T imunodominantes

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

EXPOSIÇÃO A INFECÇÃO MALÁRICA

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

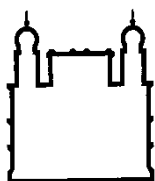
INFECÇÃO ATUAL

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

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

<input type="checkbox"/> GOTAS ESPESSAS <input type="checkbox"/> DISTENSÃO SANGUÍNEA <input type="checkbox"/> SANGUE
--

ANEXO V - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE



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



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

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

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

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

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do polimorfismo genético das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *Plasmodium falciparum* e o seu impacto nos epítomos B e T imunodominantes

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

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

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

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

Eu, Dra Lilian Rose Pratt Riccio e toda a equipe, responsáveis pelo projeto de pesquisa intitulado “Estudo da resposta imunológica contra proteínas que são candidatas à vacina contra a malária”, estamos fazendo um convite para você participar como voluntário deste nosso estudo. Esta pesquisa tem o objetivo de obter

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

um melhor conhecimento da malária. A malária é uma doença transmitida por mosquito e que causa momentos de febre alta e calafrios após os quais a pessoa fica cansada e sem forças para trabalhar. Além de verificar se você tem esta doença, vai saber que parasitos causam esta doença e quais os tipos de respostas imunológica do organismo são benéficas. A sua participação como voluntário será apenas para doar sangue.

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

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

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

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

Após o consentimento e sua assinatura do TCLE da pesquisa, você responderá a um questionário, que será aplicado por um dos membros da equipe de investigadores, onde serão anotados seus dados pessoais, observações clínicas e dados epidemiológicos. Os dados tomados neste questionário serão utilizados única e exclusivamente no projeto em questão. Suas informações neste questionário serão sigilosas e você receberá um número de registro para impossibilitar a sua identificação. Esse questionário ficará sob a guarda do Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ. O acesso a qualquer informação do questionário estará restrita à coordenadora do projeto.

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

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

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

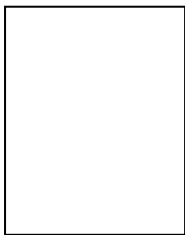
Caso precise tirar maiores dúvidas sobre o projeto, você poderá ligar a qualquer momento que achar necessário, inclusive com a possibilidade de ligar a cobrar para: Dr. Marcelo Urbano (11) 30917746, em Cruzeiro do Sul (68) 99844921, Dr. Marcos Lacerda em Manaus (92) 21273443 ou 21273498, Dr. Ricardo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

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

_____ Data: _____
Assinatura do Pesquisador

_____ Data: _____
Assinatura Testemunha

_____ Data: _____
Assinatura do Voluntário



Em caso de analfabetismo ou
impossibilidade de assinar
inserir impressão digital

ANEXO VI – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA REFERÊNCIA 3D7 COM AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO ESTUDO

1522 1641

REF 3D7 GATAATGTAAACTCTGTAACGCAAAGAGGAAATAATAACTACAACAATAATTTAGAGCGTGGATTGGGTTCTGGTGCTCTTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCTCTA

V1s1 -----

V2s1 -----

V3s1 -GA-----

V4s1 -G-----

V5s1 -----C-----

V6s1 -----C-----

V7s1 -----

V8s1 -G-----C-----

V9s1 -----C-----

1642 1761

REF 3D7 GAATTAATAAAATTAACATCAAAGGATGAAGAAGATATTATAAAGCATAATGAGGATGTGAGAGAAGAAATAGAAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGATGAAGAAGAATTGGAAAAT

V1s1 -----

V2s1 -----

V3s1 -----

V4s1 -----

V5s1 -----

V6s1 -----

V7s1 -----

V8s1 -----

V9s1 -----

1762

1881

REF 3D7 GAAGGAGAAGAAACAAAAGAAGAAGATGATGAAGAAAAGAATGAAACAAATGATACGGAAGATACGGACGATACTGAAGATACGGAAGATATAGAAGAGGAAAATAAGGAAAAAGAACTC

V1s1 -----G-----

V2s1 -----G-----

V3s1 -----

V4s1 -----G-----

V5s1 -----G-----

V6s1 -----

V7s1 -----

V8s1 -----G-----

V9s1 -----

1882

1986

REF 3D7 AGTAATCAACAACAAAGTGAAAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGAATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTGAAA

V1s1 -----C-----G

V2s1 -----GG-----C-----

V3s1 -----

V4s1 -----C-----

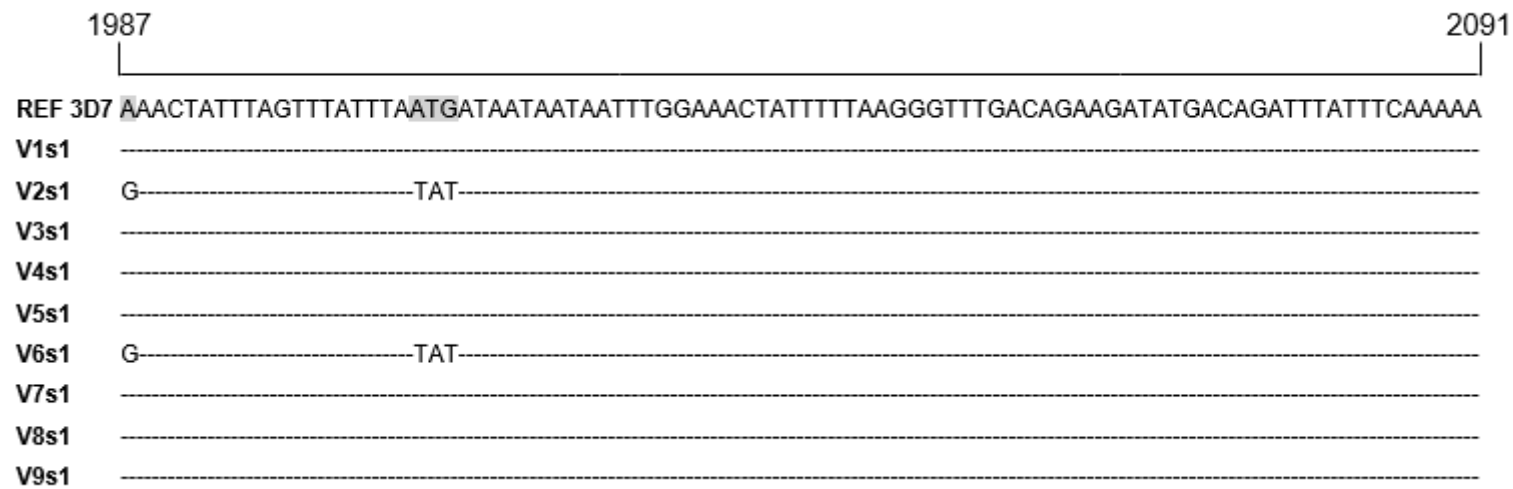
V5s1 -----C-----

V6s1 -----GG-----G

V7s1 -----GG-----

V8s1 -----C-----

V9s1 -----



Alinhamento entre a sequência referência 3D7 (trecho referente ao domínio SPAM) e as sequências nucleotídicas das variantes de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene *pfmspdbl1*. A marcação em cinza são os nucleotídeos alterados. Os traços correspondem aos nucleotídeos que não se alteraram.

427

546

REF 3D7	AAATGTCCTGATGAAAATTTTGTAAAGGGTATTA AAAATGTCTTATCCTGTCCTCCAAAAAATTCTACTGGTAGAAATGGGGATTGGATTAGTGTGGCTGTAAAGAAAGTTCAACTACA
V1d1	-----A-----
V2d1	-----A-----
V3d1	-----A-----
V4d1	-----A-G-----
V5d1	-----A-----
V6d1	-----
V7d1	-----A-----
V8d1	-----A-----C-----
V9d1	-----A-----
V10d1	-----A-G-----
V11d1	-----
V12d1	-----A-----
V13d1	-----A-----
V14d1	-----A-----C-----
V15d1	-----A-----
V16d1	-----
V17d1	-----G-----C-----
V18d1	-----A-----
V19d1	-----A-----
V20d1	-----C-----
V21d1	-----
V22d1	-----A-G-----
V23d1	-----A-G-----
V24d1	-----A-----
V25d1	-----A-----
V26d1	-----G-----
V27d1	-----
V28d1	-----A-G-----

667

786

REF 3D7 GGAGAATCAAATGCTTTAATGAAACATTATAAAGAAAAAATCTGAATGCCCTTACAGCTATAAAATATGGATTTTCAGATATGGGAGATATAATAAAGGGAACAGACCTAATTGACTAT

V1d1

V2d1

V3d1

V4d1

V5d1

V6d1

V7d1

V8d1

V9d1

V10d1

V11d1

V12d1

V13d1

V14d1

V15d1

V16d1

V17d1

V18d1

V19d1

V20d1

V21d1

V22d1

V23d1

V24d1

V25d1

V26d1

V27d1

V28d1

G

G

G

G

A

G

A

G

G

A

G

G

A

G

G

A

G

G

A

A

A

787

906

REF 3D7 CAAATTACTAAAAATATAAATAGGGCATTAGATAAAATATTACGTAATGAAACAAGTAATGACAAAATTAACGTTAGACTGGTGGGAAGCTAATAAAAGTGCATTCTGGGATGCA

V1d1		G	
V2d1		G	
V3d1		G	
V4d1		G	
V5d1		G	
V6d1			
V7d1		G	
V8d1		G	
V9d1		G	
V10d1		G	
V11d1			
V12d1	G	G	G
V13d1		G	
V14d1		G	
V15d1		G	
V16d1			
V17d1			
V18d1		G	
V19d1	G	G	
V20d1			
V21d1	G		G
V22d1		G	
V23d1		G	
V24d1		G	
V25d1		G	G
V26d1			
V27d1			
V28d1		G	

907

1026

REF 3D7 TTCATGTGTGGATATAAAGTTCATATCGGAAATAAACCATGTCCAGAACATGATAATATGGACAGAATACCACAATATCTTAGATGGTTTAGAGAATGGGGAACATATGTTTGCAGCGAA

V1d1	
V2d1	
V3d1	
V4d1	
V5d1	
V6d1	
V7d1	
V8d1	
V9d1	
V10d1	
V11d1	C
V12d1	
V13d1	
V14d1	C
V15d1	T
V16d1	
V17d1	
V18d1	
V19d1	
V20d1	C
V21d1	
V22d1	
V23d1	T
V24d1	
V25d1	
V26d1	C
V27d1	
V28d1	

1027

1146

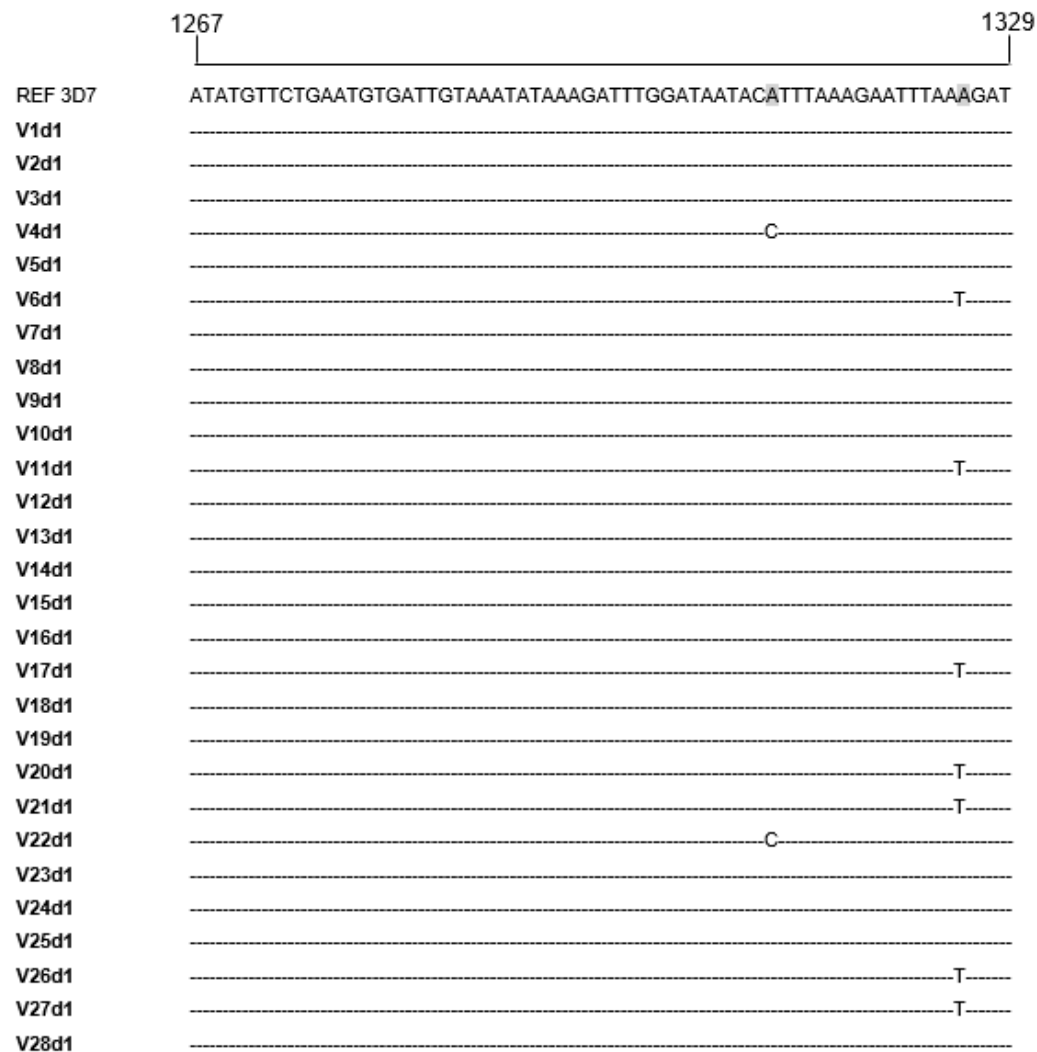
REF 3D7	TATAAAAATAAGTTTGAGGATGTAATAAAATTATGTAATATCCAACAATTTACAAACCAGGATGATTCACAACTATTAGAAATATCAAAAAGGATAAATGTAAAGAAGCATTAAAGCAT
V1d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V2d1	-----A-----G-----G-AAG-A-T-----A-A-C-----GT-----
V3d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-C-----GT-C-----C-
V4d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V5d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V6d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-----G-----GT-----
V7d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----C-
V8d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----C-
V9d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-C-----GT-C-----C-
V10d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-C-----C-
V11d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-C-----G-----GT-C-----C-
V12d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V13d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V14d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-C-----GT-C-----C-
V15d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V16d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-----G-----GT-----
V17d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-----G-----GT-C-----C-
V18d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-C-----GT-----
V19d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V20d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-----G-----GT-----
V21d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-----G-----GT-----
V22d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V23d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V24d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V25d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----
V26d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-C-----G-----GT-----
V27d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-----G-----GT-----
V28d1	-----A-----G-----G-AAG-A-----A-A-----GT-----

1147

1266

REF 3D7 TATGAAGAATGGGTTAATAGAAGGAGACCTGAATGGAAAGGCCAATGTGATAAATTTGAAAAAGAAAAAGTAAATATGAAGATACTAAAAGTATAACTGCTGAAAAATATTTAAAAGA

V1d1	-----T-----G-----T-----
V2d1	-----T-----G-----T-----
V3d1	-----T-----G-----T-----
V4d1	-----T-----G-----T-----
V5d1	-----T-----G-----T-----
V6d1	-----T-----G-----T-----
V7d1	-----T-----G-----T-----
V8d1	-----T-----G-----T-----
V9d1	-----T-----G-----T-----
V10d1	-----T-----G-----T-----
V11d1	-----T-----G-----T-----
V12d1	-----T-----G-----T-----
V13d1	-----T-----G-----T-----
V14d1	-----T-----G-----T-----
V15d1	-----T-----G-----T-----
V16d1	-----T-----G-----T-----
V17d1	-----T-----G-----T-----
V18d1	-----T-----G-----T-----
V19d1	-----T-----G-----T-----
V20d1	-----T-----G-----T-----
V21d1	-----T-----G-----T-----
V22d1	-----T-----G-----T-----
V23d1	-----T-----G-----T-----
V24d1	-----T-----G-----T-----
V25d1	-----T-----G-----T-----
V26d1	-----T-----G-----T-----
V27d1	-----T-----G-----T-----
V28d1	-----T-----G-----T-----



Alinhamento entre a sequência referência 3D7 (trecho referente ao domínio DBL) e as sequências nucleotídicas das variantes de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene *pfmspdbl1*. A marcação em cinza são os nucleotídeos alterados. Os traços correspondem aos nucleotídeos que não se alteraram.

1906 2026

REF 3D7 AAAGAAGATATAGAAGAAGAAACAGAAAGAAGATATAGAAGAAGAAACAGAAAGAAGAAACAGAAAGAAGAAACAGATGAAGAAACAGTAAAAGAAATAGAAGACAAACCA

V1s2 -----G-----

2027 2149

REF 3D7 AACAAAGAAATTAATAATCGCTAGAAAGAAAACAAATAGATAAAAATACAGATACCAGTGAAAAGAAAGGATTTAATAATTCAGAAAAAGATGAAAAGCTCGAAATTTAATTTCTAAAA

V1s2 -----

2150 2191

REF 3D7 ATTATAAAAATTATAATGAACTAGATAAAAACGTTTCATACTT

V1s2 -----

1906 2026

REF 3D7 AAAGAAGATATAGAAGAAGAAACAGAAAGAAGATATAGAAGAAGAAACAGAAAGAAGAAACAGAAAGAAGAAACAGATGAAGAAACAGTAAAAGAAATAGAAGACAAACCA

V2s2 -----G-----

2027 2149

REF 3D7 AACAAAGAAATTAATAATCGCTAGAAAGAAAACAAATAGATAAAAATACAGATACCAGTGAAAAGAAAGGATTTAATAATTCAGAAAAAGATGAAAAGCTCGAAATTTAATTTCTAAAA

V2s2 -----

2150 2191

REF 3D7 ATTATAAAAATTATAATGAACTAGATAAAAACGTTTCATACTT

V2s2 -----CT---

1906 2026

REF 3D7 AAAGAAGATATAGAAGAAGAAACAGAAGAAGATATAGAAGAAGAAACAGAAGAAGAAACAGAAGAAGAAACAGAAGAAGCAGATGAAGAAACAGTAAAAGAAATAGAAGACAAACCA

V3s2 -----

2027 2149

REF 3D7 AACAGAAATTAAAAATAAATCGCTAGAGAAAAACAAATAGATAAAAAATACAGATACCAGTGAAAAGAAAGGATTTAATAATTCAGAAAAAGATGAAAAAGCTCGAAATTTAATTTCTAAAA

V3s2 -----

2150 2191

REF 3D7 ATTATAAAAATTATAATGAACTAGATAAAAACGTTCAACTT

V3s2 -----CT---

Alinhamento entre a sequência referência 3D7 (trecho referente ao domínio SPAM) e as sequências nucleotídicas das variantes de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene *pfmspdbl2*. A marcação em cinza são os nucleotídeos alterados. Os traços correspondem aos nucleotídeos que não se alteraram.

481 601

REF 3D7 AAATGTCTACTGAAGAGATTTGTAAGACTTTAGTAATCTTCCACAATGTCGAAAGAATGTACATGAAAGAAATAATTGGTTGGGCTCAAGTGTAATAAATTTTCAAGTGATAATAAGG

V1d2 _____

V2d2 _____

602 723

REF 3D7 GGGTTCCTGTTCTCCAAGAAGACAATCTTTATGTTTAAGAATTACATTACAAGATTTTCGTACGAAAAAGAAAAAGGAAGGAGATTTTGAAAAATTTATTTATTCATATGCATCATCTGAA

V1d2 _____

V2d2 _____

724 844

REF 3D7 GCTAGAAAATTAAGAACCATACACAATAATAACTTAGAAAAAGCTCATCAAGCTATAAGATATAGTTTTGCAGATATTGGAAATATTATTAGAGGAGATGACATGATGGATACACCTACGT

V1d2 _____

V2d2 _____

785 966

REF 3D7 AAAAGAAACCATAACATATTTAGAAAAAGTACTTAAAAATTTATAATGAAAATAATGATAAACCAAAAGATGCAAAAAATGGTGGACAGAAAACAGGCATCATGTTTGGGAAGCAATGATG

V1d2 _____

V2d2 _____

967 1085

REF 3D7 TGCGGATATCAGAGTGCGCAGAAAGATAACCAATGTACAGGTTATGGTAACATTGATGATATACCACAATTTTTAAGGTGGTTCAGAGAGTGGGGAACATATGTCTGTGAAGAAAGCGA

V1d2 _____

V2d2 _____

1086 1206

REF 3D7 AAAAAATATGAACACACTAAAAGCTGTTTGCTTTCGAAACAGCCAAGAACCGAAGCGAATCCTGCATTGACTGTACATGAAAATGAAATGTGCTCATCAACTTTAAAAAATATGAAGAA

V1d2 _____

V2d2 _____

1207 1329

REF 3D7 TGGTATAATAAAAGGAAAAGTGAATGGACTGAACAATCTATTAATATAACAATGACAAAATTAATTATACAGATATAAAAACATTATCTCCTTCTGAATATTTAATAGAAAAATGTCCTGAA

V1d2 -----

V2d2 -----C-----

1330 1371

REF 3D7 TGTAAATGTACCAAAAAAATTTGCAAGATGTATTTGAACTT

V1d2 -----

V2d2 -----

Alinhamento entre a sequência referência 3D7 (trecho referente ao domínio DBL) e as sequências nucleotídicas das variantes de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene *pfmspdbl2*. Os traços correspondem os nucleotídeos que não se alteraram.

ANEXO VII – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AA DA REFERÊNCIA 3D7 COM AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO ESTUDO

	508	603
REF 3D7	DNVNSVTQRGNNNYNNNLERGLGSGALPGTNIITEEKYSLELIKLTSKDEEDIKHNEDVREEIEEQQEDIEEDEEELENEGEETKEEDDEEKNET	
V1s1	-----	
V2s1	-----	
V3s1	G-----	-----
V4s1	E-----	-----
V5s1	-----S-----	-----
V6s1	-----S-----	-----
V7s1	-----	
V8s1	E-----S-----	-----
V9s1	-----S-----	-----
	604	696
REF 3D7	NDTETDDTETEDIEEENKEKELSNQQQSEKKSISKVDEDSYRILSVSYKDNNEVKNVAESIVKKLFSLFNDNNNLETIFKGLTEDMTDLFQK	
V1s1	-----E-----	-----
V2s1	-----E-----	-----G-----E-----IY-----
V3s1	-----	
V4s1	-----E-----	-----
V5s1	-----E-----	-----
V6s1	-----	-----G-----E-----IY-----
V7s1	-----	-----G-----
V8s1	-----E-----	-----
V9s1	-----	

Comparação entre a sequência referência 3D7 (trecho referente ao domínio SPAM) e as sequências de aminoácidos dos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene *pfmspdbl1*. A marcação em cinza são os aminoácidos alterados. Os traços correspondem os aminoácidos que não se alteraram.

143

263

REF 3D7 KCPDENFCKGIKNVLSCPPKNSTGRNGDWISVAVKESSTTNKGVLPVPRRTKLCLRNINKVWHRIKDEKNFKEEFVKVALGESNALMKHYKEKNLNALTAIKYGFSDMGDIKGTDLIDYQ

V1d1	-----T-----
V2d1	-----T-----R-----
V3d1	-----T-----R-----
V4d1	-----T-----P-----
V5d1	-----T-----
V6d1	-----K-----
V7d1	-----T-----K-----K-----
V8d1	-----T-----P-----K-----K-----N-----
V9d1	-----T-----K-F-----L-----R-----N-----
V10d1	-----T-----K-----K-----
V11d1	-----K-----
V12d1	-----T-----
V13d1	-----T-----K-----
V14d1	-----T-----P-----K-F-----L-----K-----K-----R-----N-----
V15d1	-----T-----
V16d1	-----
V17d1	-----P-----K-F-----L-----K-----K-----R-----N-----
V18d1	-----T-----K-----
V19d1	-----T-----K-----
V20d1	-----P-----N-----
V21d1	-----K-----k-----R-----
V22d1	-----T-----
V23d1	-----T-----
V24d1	-----T-----K-----N-----
V25d1	-----T-----
V26d1	-----K-F-----N-----
V27d1	-----
V28d1	-----T-----P-----

REF 3D7 ITKNINRALDKILRNETSNDKIKKRVDWWEANKSAFWDAFMCGYKVHIGNKPCPEHDNMDRIPQYLRWFREWGTYVCSSEYKNKFEDVIKLCNIQQFTNOQDDSQLLEISKKDKCKEALKHY

V1d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V2d1 -----G-----N-E-VR-IS-NE-----G-----

V3d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-P-----

V4d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V5d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V6d1 -----N-E-VR-I-N-----E-G-----

V7d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-P-----

V8d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-P-----

V9d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-P-----

V10d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-P-----

V11d1 -----R-----N-E-VR-I-N-----E-G-P-----

V12d1 -----G-----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V13d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V14d1 -----G-----R-----N-E-VR-I-NE-----G-P-----

V15d1 -----G-----F-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V16d1 -----N-E-VR-I-N-----E-G-----

V17d1 -----N-E-VR-I-N-----E-G-P-----

V18d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V19d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V20d1 -----R-----N-E-VR-I-N-----E-G-----

V21d1 -----G-----N-E-VR-I-----E-G-----

V22d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V23d1 -----G-----F-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V24d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V25d1 -----G-----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

V26d1 -----R-----N-E-VR-I-N-----E-G-----

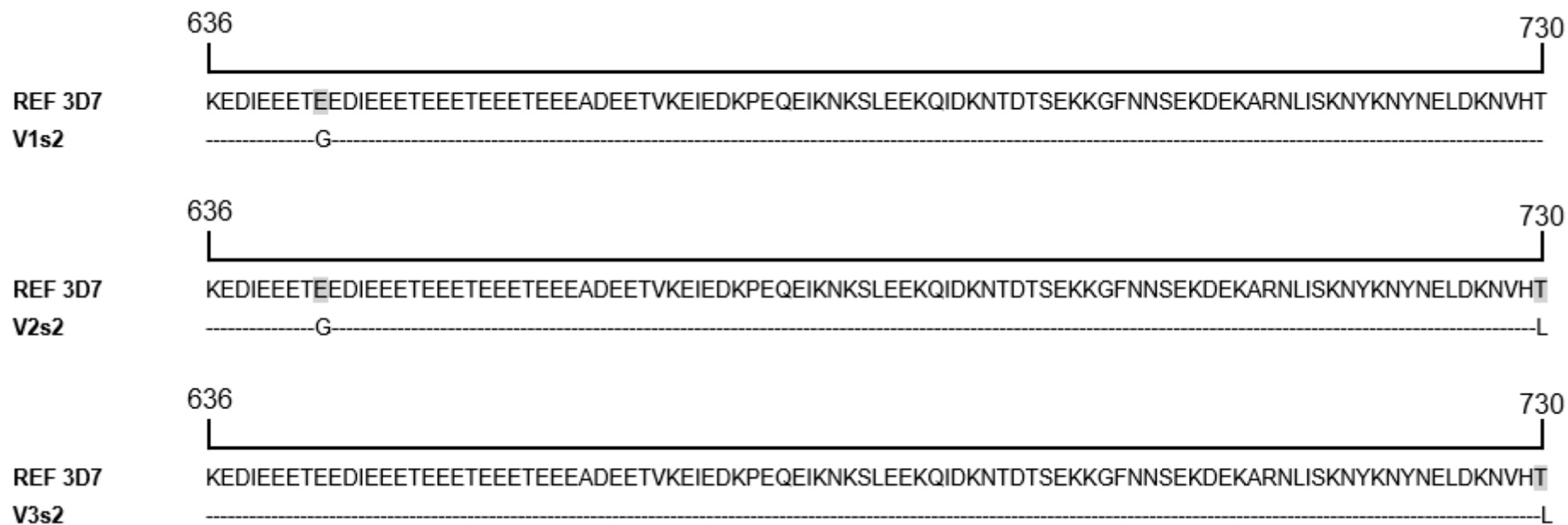
V27d1 -----N-E-VR-I-N-----E-G-----

V28d1 -----G-----N-E-VR-I-NE-----G-----

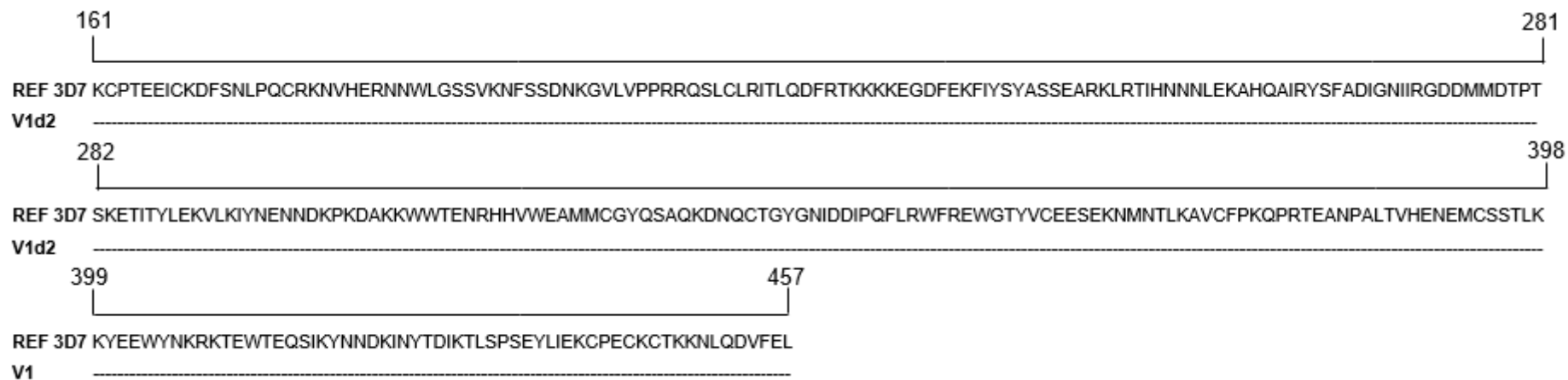
	384	443

REF 3D7	EEWVNRPRPEWKGQCDKFEKEKSKYEDTKSITAEKYLKEICSECDCCKYKDLNDFKEFKD	
V1d1	-----R-I-----	
V2d1	-----R-I-----	
V3d1	-----R-I-----	
V4d1	-----R-I-----	
V5d1	-----R-I-----	
V6d1	-----R-I-----N-	
V7d1	-----R-I-----	
V8d1	-----R-I-----	
V9d1	-----R-I-----	
V10d1	-----R-I-----	
V11d1	-----R-I-----N-	
V12d1	-----R-I-----	
V13d1	-----R-I-----	
V14d1	-----R-I-----	
V15d1	-----R-I-----	
V16d1	-----R-I-----	
V17d1	-----R-I-----N-	
V18d1	-----R-I-----	
V19d1	-----R-I-----	
V20d1	-----R-I-----N-	
V21d1	-----R-I-----N-	
V22d1	-----R-I-----	
V23d1	-----R-I-----	
V24d1	-----R-I-----	
V25d1	-----R-I-----	
V26d1	-----R-I-----N-	
V27d1	-----R-I-----N-	
V28d1	-----R-I-----	

Comparação entre a sequência referência 3D7 (trecho referente ao domínio DBL) e as sequências de aminoácidos dos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene *pfmspdbl1*. A marcação em cinza são os aminoácidos alterados. Os traços correspondem aos aminoácidos que não se alteraram.



Comparação entre a sequência referência 3D7 (trecho referente a domínio SPAM) e as sequências de aminoácidos dos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene *pfmspdbl2*. A marcação em cinza são os aminoácidos alterados. Os traços correspondem aos aminoácidos que não se alteraram.



Comparação entre a sequência referência 3D7 (trecho referente ao domínio DBL) e as sequências de aminoácidos dos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene pfmspdb2. Os traços correspondem aos aminoácidos que não se alteraram.