

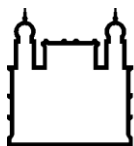
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

**Análise do polimorfismo genético da PvCelTOS (*P. vivax* Cell-  
Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites) em isolados de  
diferentes áreas endêmicas da Amazônia Brasileira**

LANA BITENCOURT CHAVES

Rio de Janeiro  
Março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**LANA BITENCOURT CHAVES**

Análise do polimorfismo genético da PvCeITOS (*P. vivax* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites) em isolados de diferentes áreas endêmicas da Amazônia Brasileira

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

**ORIENTADOR:** Dr. Josué da Costa Lima Junior.

RIO DE JANEIRO  
Março de 2017

Chaves, Lana Bitencourt .

Análise do polimorfismo genético da PvCelTOS (P. vivax Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites) em isolados de diferentes áreas endêmicas da Amazônia Brasileira / Lana Bitencourt Chaves. - Rio de Janeiro, 2017.

105 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: Josué da Costa Lima Junior.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. PvCelTOS. 2. Isolados de campo de Plasmodium. 3. Plasmodium vivax. 4. Diversidade genética. 5. Predição de epítomos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: LANA BITENCOURT CHAVES**

**Análise do polimorfismo genético da PvCelTOS (*P. vivax* Cell-  
Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites) em isolados de  
diferentes áreas endêmicas da Amazônia Brasileira**

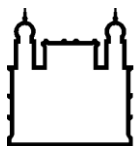
**ORIENTADOR: Dr. Josué da Costa Lima Junior**

**Aprovada em: 28/03/2017**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino - (FIOCRUZ)  
Prof. Dra. Fernanda Nazaré Morgado - (FIOCRUZ)  
Prof. Dra. Cynthia Chester Cardoso - (UFRJ)  
Prof. Dra. Juliana Fernandes Cardoso - (INCA)  
Prof. Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães - (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 28 de março de 2017.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Reservado para a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

## AGRADECIMENTOS

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

Ao meu querido orientador Dr. Josué da Costa Lima Junior, por ter me acolhido em seu laboratório e ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, incentivo, confiança, dedicação e amizade que contribuíram para o meu crescimento profissional e acadêmico.

Agradeço também a Dra. Daiana de Souza Perce da Silva por ter sido tão presente ao longo desses dois anos. Obrigada por toda a ajuda, tanto na parte experimental, quanto teórica deste trabalho. Agradeço não só pelo seu apoio, que foi fundamental durante este percurso, como também pelo seu incentivo, pelas conversas e risadas que tornaram os meus dias mais divertidos. Obrigada também pelos seus conselhos e pela bela amizade que construímos ao longo desses anos!!

À Dra. Dalma Maria Banic, do Laboratório de Imunologia clínica. Obrigada pela hospitalidade, o apoio de sempre, seu incentivo e todos os valiosos ensinamentos. Agradeço também a Dra. Raquel Alves Pinna por todo apoio e ajuda quando precisei, e às amigas do laboratório: Samantha Lucciola e Amanda Melo.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia, onde eu comecei a trajetória desde a iniciação científica ao lado da Dra. Paula Mello De Luca, e onde tive o seu apoio e o companheirismo de muitas pessoas ao longo desse tempo. Agradeço também aos pesquisadores Dr. Álvaro Bertho, Dra. Fátima da Conceição e Dra. Joseli de Oliveira Ferreira.

Agradeço ao doutorando Rodrigo Nunes por toda a ajuda, e às amigas: Isabela Soares, Rafaela Veiga, Alinne Renzetti e Virgínia Araujo. Agradeço também a querida Dra. Léa Cysne pelas belas e sábias palavras, e o grande incentivo de sempre.

À Dra. Lilian Rose Pratt Riccio pelos seus ensinamentos e ajuda com a parte experimental.

À Dra. Antônia Franco e Dra. Francimeire Gomes, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, pela coleta das amostras de Manaus, utilizadas neste estudo.

Ao Dr. Paulo Renato Rivas Totino por aceitar o convite de fazer a revisão desta dissertação e aos membros da banca examinadora pela participação: Dra. Fernanda Nazaré Morgado, Dra. Cynthia Chester Cardoso, Dra. Juliana Fernandes Cardoso, Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães.

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

Ao Dr. João Hermino Martins da Silva, do Departamento de Bioinformática (Fiocruz-CE), Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA) e ao Dr. Gustavo Capatti Cassiano, do Departamento de genética (São Paulo - SP), pela colaboração teórica de suma importância neste trabalho.

À FIOCRUZ e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária.

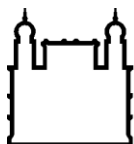
À FAPERJ e a CAPES pelo auxílio financeiro.

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

Em especial, agradeço a todos os meus amigos e familiares que me apoiaram e que, de certa forma, participaram de momentos importantes ao longo desse tempo. Aos meus amados pais e ao meu irmão Diego Bitencourt, minha imensa gratidão. Obrigada por todo amor incondicional e incentivo ao longo dessa caminhada!!

Ao meu querido namorado Allan Alves, pelo imenso amor, carinho e cumplicidade. Obrigada por estar sempre ao meu lado e me apoiar em todos os momentos!!

Agradeço a todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização de mais uma etapa em minha vida. MUITO OBRIGADA!!!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Análise do polimorfismo genético da PvCelTOS (*P. vivax* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites) em isolados de diferentes áreas endêmicas da Amazônia Brasileira

#### RESUMO

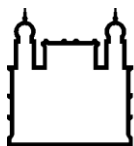
#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

#### LANA BITENCOURT CHAVES

A PvCelTOS (*Plasmodium vivax* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites) desempenha um papel importante na travessia de células hospedeiras. Mesmo sendo essencial para o progresso da PvCelTOS como uma candidata vacinal, o conhecimento sobre a sua diversidade genética permanece desconhecido. Assim, investigamos o polimorfismo genético da PvCelTOS a partir da amplificação gênica por PCR e sequenciamento de 119 amostras de isolados de *P. vivax* oriundos de cinco diferentes localidades da Amazônia Brasileira (Manaus, Novo Repartimento, Porto Velho, Plácido de Castro e Oiapoque) e avaliamos o potencial impacto de mutações não sinônimas na estrutura tridimensional e nos epítomos da PvCelTOS através de ferramentas de predição *in silico*. Nossos dados mostram que os isolados de campo apresentam alta similaridade (99,3% de pb) com a cepa de referência Sal-1, apresentando apenas quatro polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) nas posições 24A, 28A, 109A e 352C. A frequência da mutação sinônima C109A (82%) foi maior do que todas as outras ( $p < 0,0001$ ). As mutações não sinônimas G28A e G352C foram observadas em 9,2% e 11,7% dos isolados, respectivamente. A grande maioria dos isolados (79,8%) revelou homologia completa da sequência de aminoácidos com Sal-1, 10,9% apresentaram homologia completa com o genoma *Brazil I* e duas sequências não descritas da PvCelTOS foram observadas em 9,2% dos isolados de campo. Em relação à análise de predição, previu-se que a substituição N-terminal (Gly10Ser) estava dentro de um potencial epítopo de célula B e exposta à superfície da proteína, enquanto que a substituição Val118Leu não é um epítopo predito. Por conseguinte, os nossos dados sugerem que, o SNP G28A pode interferir em epítomos potenciais de células B na região N-terminal da PvCelTOS, enquanto que não parece haver interferência nos epítomos de células TCD8<sup>+</sup>. Além disso, sua sequência genética é altamente conservada entre isolados de diferentes regiões geográficas, sendo uma característica importante em relação ao seu potencial como vacina candidata.

Palavras-chave: PvCelTOS, isolados de campo de *Plasmodium*, *Plasmodium vivax*, Diversidade genética, SNPs, Predição de epítomos.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Analysis of the genetic polymorphism of PvCelTOS (*P. vivax* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites) in isolates from different endemic areas of the Brazilian Amazon**

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

#### LANA BITENCOURT CHAVES

The PvCelTOS (*Plasmodium vivax* Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites) plays an important role in traversal of host cells. Even essential to PvCelTOS progress as a vaccine candidate, the knowledge about its genetic diversity remains uncharted. Therefore, we investigated the PvCelTOS genetic polymorphism by PCR gene amplification and sequencing of 119 field isolates of *P. vivax* from five different regions of Brazilian Amazon Region (Manaus, Novo Repartimento, Porto Velho, Plácido de Castro and Oiapoque) and we evaluated the potential impact of non - synonymous mutations found in the three - dimensional structure and in the epitopes of PvCelTOS through *in silico* prediction tools. Our data show that field isolates presented high similarity (99.3% of bp) with the reference Sal-1 strain, presenting only four Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) at positions 24A, 28A, 109A and 352C. The frequency of synonymous C109A (82%) was higher than all others ( $p < 0.0001$ ). The non-synonymous G28A and G352C were observed in 9.2% and 11.7% of isolates, respectively. The great majority of the isolates (79.8%) revealed complete amino acid sequence homology with Sal-1, 10.9% presented complete homology with Brazil I and two undescribed PvCelTOS sequences were observed in 9.2% of field isolates. Concerning the prediction analysis, the N-terminal substitution (Gly10Ser) was predicted to be within a B-cell epitope and exposed at protein surface, while the Val118Leu substitution is not a predicted epitope. Therefore, our data suggest that SNP could interfere in potential B-cell epitopes at N-terminal region PvCelTOS, whereas there appears to be no interference in the epitopes of TCD8<sup>+</sup> cells. In addition, its genetic sequence is highly conserved among isolates from different geographic regions, being an important feature in relation to its potential as a vaccine candidate.

Key words: PvCelTOS, *Plasmodium* field isolates, *Plasmodium vivax*, Genetic diversity, SNPs, Prediction of epitopes.

# ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Malária: aspectos gerais.....	1
1.2 A malária no mundo .....	2
1.3 A malária no Brasil .....	4
1.4 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp.....	5
1.5 Diagnóstico laboratorial .....	8
1.6 Estratégias de controle da malária .....	9
1.7 Antígenos candidatos vacinais de <i>Plasmodium vivax</i> .....	9
1.8 CeITOS (Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites).....	12
1.9 Justificativa .....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1 Área de estudo e coleta de amostras .....	18
3.2 Descrição das áreas de estudo .....	19
3.3 Exame microscópico direto para o diagnóstico de malária.....	20
3.4 Aspectos Éticos da Pesquisa .....	21
3.5 Extração do DNA.....	21
3.6 Desenho dos iniciadores específicos ( <i>primers</i> ) da PvCeITOS .....	22
3.7 Reação de Polimerização em Cadeia / Polymerase Chain Reaction (PCR) do gene <i>pvceltos</i> .....	22
3.8 Purificação dos produtos de PCR.....	23
3.9 Reação de sequenciamento do DNA .....	24
3.10 Análise do polimorfismo .....	25
3.11 Modelo 3D e análise eletrostática da PvCeITOS.....	26
3.12 Predição <i>in silico</i> de epítomos de células B e células T .....	26
3.13 Análise estatística.....	28

4	RESULTADOS.....	29
4.1	Caracterização molecular da PvCeITOS nas regiões estudadas .....	29
4.2	Frequência de haplótipos encontrada na população de estudo .....	32
4.3	Análise genética da população.....	34
4.4	Substituições de aminoácidos e demais sequências gênicas de <i>P. vivax</i> .....	36
4.5	Modelagem molecular e predição de epítomos.....	38
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÕES.....	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8	ANEXOS.....	56
8.1	Artigo I.....	56
8.2	Artigo II.....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Transmissão de malária no mundo. ....	3
<b>Figura 2</b> – Distribuição espacial de <i>P. vivax</i> em 2010. ....	3
<b>Figura 3</b> - Mapa de risco da malária por município de infecção no Brasil em 2014....	5
<b>Figura 4</b> - Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp no hospedeiro vertebrado e invertebrado. ....	6
<b>Figura 5</b> - Candidatos vacinais de malária em ensaios clínicos (46).....	11
<b>Figura 6</b> - Modelo para a CelTOS na passagem celular.....	13
<b>Figura 7</b> - Comparação das sequências de aminoácidos da CelTOS de <i>P. berghei</i> com as ortólogas de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> .....	14
<b>Figura 8</b> - Mapa geográfico mostrando os cinco locais de estudo e a respectiva Incidência Parasitária Anual (IPA).....	18
<b>Figura 9</b> - Amplificação por PCR do gene <i>pvceltos</i> . ....	29
<b>Figura 10</b> - Análise da diversidade genética da PvCelTOS nos isolados de <i>P. vivax</i> . ....	31
<b>Figura 11</b> - Alinhamento das sequências das proteínas e frequência das mutações nos isolados. ....	37
<b>Figura 12</b> - Estrutura de modelagem e análise <i>in silico</i> de PvCelTOS. ....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distância em km entre os 5 locais de estudo.....	20
<b>Tabela 2</b> - Mutações e substituições correspondentes aos aminoácidos no gene <i>pvceltos</i> . .....	31
<b>Tabela 3</b> - Distribuição dos haplótipos da PvCeITOS entre as 5 localidades estudadas da Amazônia Brasileira. ....	33
<b>Tabela 4</b> - Comparação da diversidade genética entre os isolados da Amazônia Brasileira. ....	35
<b>Tabela 5</b> - Diferenciação genética entre os isolados da Amazônia Brasileira, mensurado por valores pareados ( $F_{ST}$ ). ....	35

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
AMA-1	Antígeno 1 de Membrana Apical
API	Incidência Parasitária Anual
<i>An</i>	<i>Anopheles</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Grau Celsius
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
CSP	Proteína Circunsporozoíta
DBP	Proteína de Ligação ao Antígeno Duffy
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ddNTPs	Didesoxinucleotídeo Trifosfatados
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	Força da gravidade
H	Haplótipos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IEDB	Immune Epitope Database and Analysis Resource
IFN	Interferon
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
ng	Nanograma
OIP	Oiapoque
OMS	Organização Mundial da Saúde

PA	Ácido fosfatídico
PB	Pares de base
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
PLC	Plácido de Castro
pmol	Picomol
MAO	Manaus
MSP-1	Proteína de Superfície do Merozoíto 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NR	Novo Repartimento
PvCeITOS	<i>Plasmodium vivax</i> Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites
PVL	Porto Velho
RPM	Rotações por minuto
Sal-1	Salvador-1
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TA	Temperatura ambiente
Tp	Tampão de sequenciamento
TRAP	Proteína Adesiva relacionada à Trombospondina
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Malária: aspectos gerais

Também conhecida como paludismo ou impaludismo (do latim *palus*, pântano), a malária acompanha os seres humanos desde a antiguidade. Acredita-se, inclusive, que a origem dessa doença é anterior ao surgimento da espécie humana, devido a grande diversidade de plasmódios existentes e a capacidade de infectar diferentes vertebrados terrestres (1). A malária foi primeiramente descrita por Hipócrates, na era pré-cristã, quem descreveu as características da doença, como a ocorrência de febre intermitente. Apenas no início do século XIX é que o termo malária foi utilizado. Os romanos pensavam que a doença era causada por vapores eliminados nos pântanos, chamando a doença de “*mau aire*”, em sentido literal “mau ar”. Acreditava-se que a doença provinha dos miasmas, emanações venenosas das águas paradas dos pântanos. A suposição da natureza miasmática da doença foi amplamente difundida, até que em 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran identificou devidamente o parasito *Plasmodium* como o causador da malária, enquanto a incriminação dos mosquitos como vetores foi feita pelo médico Ronald Ross, em 1894 (2, 3).

Desde a antiguidade, a malária teve um impacto direto sobre a saúde, com efeitos indiretos em fatores como desenvolvimento econômico, migração e conflitos militares na história mundial. A partir do momento em que a malária foi reconhecida, tem sido notório a importância das condições ambientais, aliadas às transformações socioeconômicas, na transmissão da doença. Sua transmissão, nos seres humanos, se estabeleceu possivelmente a cerca de 10 mil anos antes de Cristo (a.C.), com o advento da agricultura. Nesse momento histórico, houve um grande aumento da densidade na população humana e vetorial, quando o homem deixou de ser nômade e passou a viver em assentamentos (4).

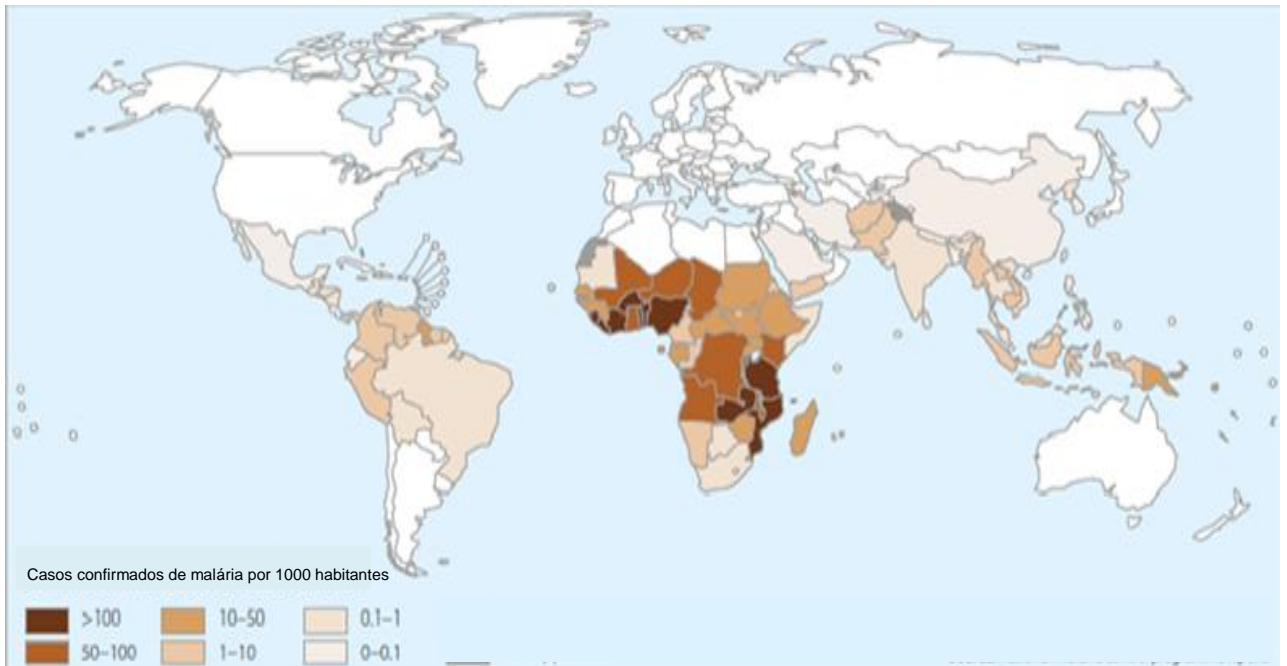
Atualmente, sabe-se que a malária é uma doença infecciosa e parasitária que apresenta elevada prevalência e morbidade. É causada por protozoários do Filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*, no qual são descritos, atualmente, cinco espécies que infectam seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (5). Os vetores de *Plasmodium* sp. são as

fêmeas de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles*. No Brasil, as principais espécies transmissoras de malária são: *An. darlingi*, o principal mosquito vetor, estando presente em cerca de 80% do país (6) e *An. Aquasalis*, vetor secundário (7).

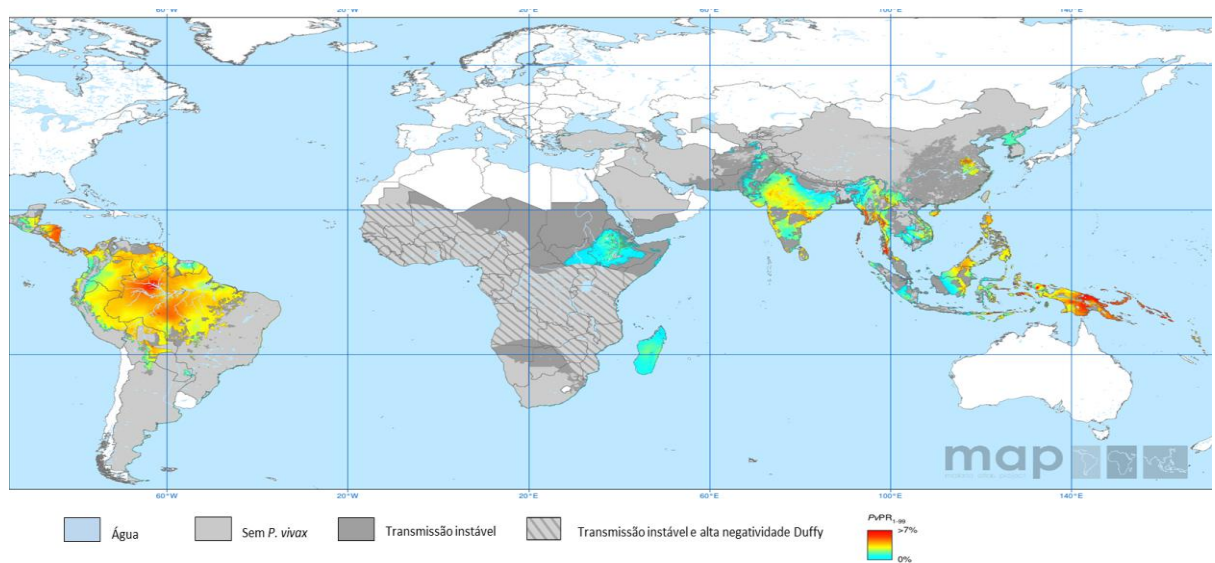
## 1.2 A malária no mundo

A malária é uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo, sendo considerado um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 1). Globalmente, estima-se que 3,2 bilhões de pessoas em 91 países estão em risco de se infectarem. A maioria dos casos e mortes ocorre na África Subsaariana. Em 2016, ocorreu um número estimado de 212 milhões de novos casos de malária e cerca de 429.000 mortes, principalmente em crianças africanas. No entanto, estimativas demonstraram que entre 2010 e 2015, houve uma redução global de 41% na incidência de malária entre as populações em risco, bem como uma redução na taxa de mortalidade em 62% (5). Um número crescente de países tem obtido progresso no plano de eliminação da malária e, atualmente, 20 países se encontram em fase de pré-eliminação e de eliminação e oito em fase de prevenção de reintrodução da doença.

Dentre as cinco espécies de protozoários causadores da malária humana, as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo, causando grande morbidade nas regiões afetadas. O *P. falciparum* é o parasita da malária mais frequente no continente Africano e responsável pela maioria das mortes relacionadas com a malária no mundo todo. Já o *P. vivax* tem a mais ampla distribuição geográfica (Figura 2) (5) dentre os parasitas da malária humana, sendo dominante na maioria dos países fora da África Subsaariana (8). Além disso, o *P. vivax* possui fácil adaptação a zonas tropicais e temperadas, em virtude de suas características biológicas, como o desenvolvimento de hipnozoítas (formas latentes do parasito) e o tempo de incubação variável (9). Apesar desta reconhecida importância epidemiológica, por vezes o *P. vivax* é deixado à sombra do *P. falciparum* diante do grande problema associado às formas graves da doença na África (10).



**Figura 1** – Países com transmissão de malária.  
Adaptado e traduzido. Fonte: Organização Mundial da Saúde (5).



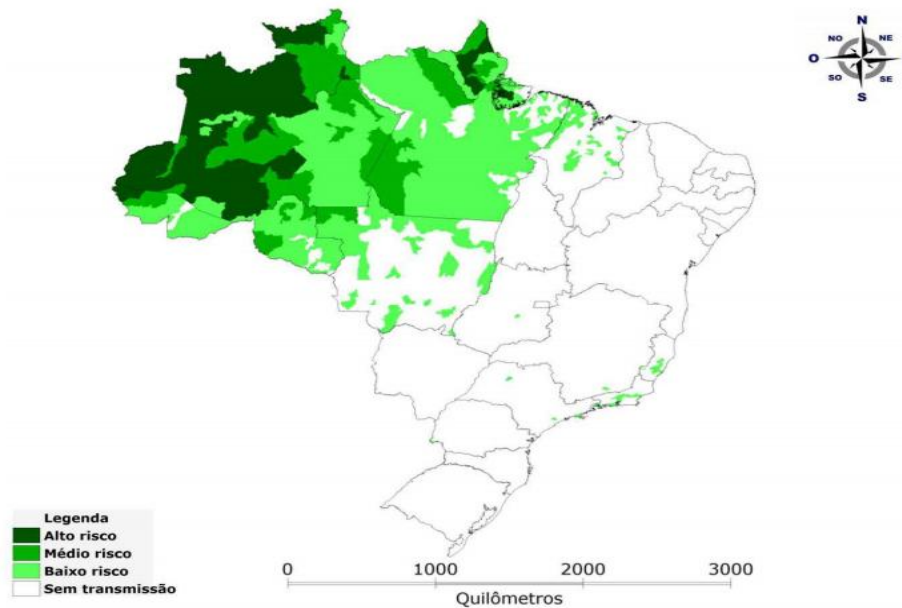
**Figura 2** – Distribuição espacial de *P. vivax* em 2010.  
Adaptado e traduzido. Fonte: Organização Mundial da Saúde.

### 1.3 A malária no Brasil

No Brasil, mais de 99% dos casos notificados de malária procedem da Amazônia Legal (Figura 3), região Amazônica Brasileira, que é composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (5). Embora existam três espécies de *Plasmodium* causadores de malária no Brasil (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*), aproximadamente 87% dos 142 mil casos reportados em 2015 foram causados pelo *P. vivax* (11). De acordo com a OMS, o Brasil registrou um menor número de casos de malária nos últimos 35 anos. Contudo, a malária ainda é um grande problema de saúde pública no Brasil e, portanto, é extremamente importante o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção para bloquear ou reduzir esta transmissão.

Na Amazônia Legal Brasileira, as condições socioeconômicas e os fatores ambientais, como o desmatamento, contribuem para a transmissão de malária. Diversos fatores promoveram o agravamento e a manutenção da transmissão de malária nessa região, como o fluxo intenso e a ocupação desordenada nas áreas periurbanas, o desmatamento para extração de madeira, a criação de gado, a mineração e a agricultura (12).

Uma pequena parte dos casos notificados de malária, no Brasil, ocorre em regiões extra-amazônicas. Nessas regiões, a transmissão da infecção se deve, em grande parte, ao fluxo constante de pessoas infectadas provenientes de áreas endêmicas dentro e fora do país, somado à existência dos vetores anofelinos. Apenas 0,05% de todos os casos são causados pela malária autóctone da Mata Atlântica, localizados principalmente ao longo da costa do Atlântico Sudeste. A malária de Mata Atlântica parece ser causada pelo *P. vivax* e, em menor proporção, pelo *P. malariae*, ou ainda por plasmódios que acometem simianos e que são transmitidos pelo mosquito *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (6, 13).



**Figura 3** - Mapa de risco da malária por município de infecção no Brasil em 2015.

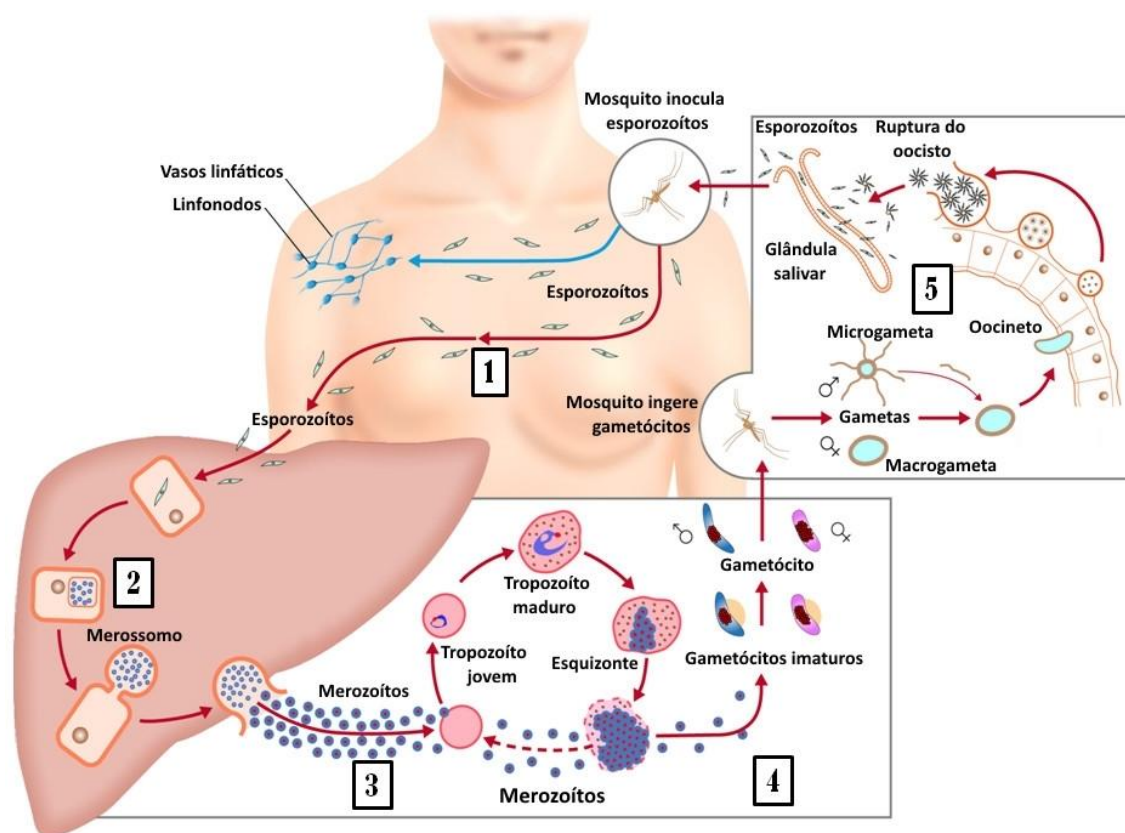
Fonte: Ministério da saúde (14).

#### 1.4 Ciclo biológico do *Plasmodium* sp.

O ciclo biológico do *Plasmodium* (Figura 4) é constituído por uma fase sexuada (esporogônica), que ocorre em fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* (hospedeiro invertebrado), e uma fase assexuada (esquizogônica), que ocorre no homem (hospedeiro vertebrado), podendo também, dependendo da espécie, ocorrer em aves, mamíferos ou répteis.

No homem, o ciclo biológico do parasito se inicia durante o repasto sanguíneo de uma fêmea infectada, onde as formas infectantes (esporozoítos) são inoculadas na pele do hospedeiro, podendo permanecer neste local por algumas horas antes de encontrarem um vaso sanguíneo (15). Os esporozoítos são liberados principalmente na pele e não diretamente na corrente sanguínea, como se acreditou por muito tempo (16). Uma parte desses parasitos é drenada para os vasos linfáticos, atingindo os linfonodos, podendo se desenvolver como formas exo-eritrocíticas (15). No entanto, apenas aqueles que atingem a circulação sanguínea são capazes de se desenvolverem e dar continuidade ao ciclo eritrocítico, enquanto os demais parecem atuar como uma fonte de antígenos para o sistema imune adaptativo (17, 18). Os esporozoítos que atravessam o endotélio e chegam à circulação sanguínea são

transportados passivamente até o fígado, onde infectam os hepatócitos e iniciam o estágio hepático (19). Essa fase, chamada de estágio pré-eritrocítico, terá uma duração dependente da espécie de *Plasmodium*.



**Figura 4** - Ciclo biológico do *Plasmodium* sp no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Adaptado de García-Basteiro *et al.* 2012 (20). (1) Esporozoítos após serem inoculados pelo mosquito vetor e migração na pele do hospedeiro vertebrado; (2) Fase pré-eritrocítica (hepática); (3) Fase eritrocítica – merozoítos invadindo eritrócitos, com subsequente desenvolvimento intraeritrocítico; (4) Estágio sexual do parasita (gametócitos) no hospedeiro vertebrado; (5) Ingestão dos gametócitos (formas infectantes) pelo inseto vetor e desenvolvimento do estágio sexuado em seu intestino médio.

A invasão do hepatócito pelo esporozoíto é complexa e envolve várias interações entre o parasito e a célula hospedeira. No fígado, os esporozoítos migram ativamente, atravessando o citosol de várias células antes de invadir aquele hepatócito que será o seu local de desenvolvimento e replicação, por ocasião da formação de um vacúolo parasitóforo ao seu redor (21, 22). Essa intensa travessia por diversos hepatócitos parece ser um processo obrigatório para tornar os esporozoítos capazes de estabelecer a infecção nesta célula-alvo, sendo um passo essencial do ciclo de vida do *Plasmodium* (23). Algumas espécies como, o *P. vivax* e

o *P. ovale* podem se desenvolver em formas latentes do parasito no fígado, denominadas hipnozoítos, que são responsáveis pela ocorrência de recaídas da doença (24).

Após a invasão bem sucedida do hepatócito com a formação de um vacúolo parasitóforo, o esporozoíto se converte de uma forma invasiva a uma forma ativa replicativa: o trofozoíto pré-eritrocítico (hepático). Uma vez desdiferenciado, o trofozoíto sofre sucessivas divisões pelo processo de esquizogonia, passando por um rápido crescimento e replicação do DNA, como também das suas organelas, promovendo, dessa forma, o desenvolvimento de um sincício multinucleado, conhecido como esquizonte hepático (ou tecidual) (25). Após a maturação dos esquizontes, milhares de merozoítos são formados e liberados na corrente sanguínea, envoltos pela membrana plasmática dos hepatócitos, sendo denominados merossomos (26).

Posteriormente, os merossomos se rompem na corrente sanguínea e, então, os merozoítos aderem e invadem os eritrócitos rapidamente (27). Inicia-se então a fase eritrocítica do ciclo da malária, na qual os merozoítos se diferenciam, dentro do eritrócito, em trofozoítos jovens, depois em trofozoítos maduros e, finalmente, dão origem aos esquizontes eritrocíticos. Após a lise do eritrócito parasitado, os novos merozoítos liberados na corrente sanguínea são capazes de invadir novas hemácias, dando continuidade ao ciclo eritrocítico, resultando nos sintomas clínicos da doença. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, uma pequena parte destes parasitos se diferencia, sem divisão nuclear, em estágios sexuais, os gametócitos femininos e masculinos (28-30). Estas formas sexuais ao serem ingeridas pelo mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo dão início à fase sexuada do ciclo, que ocorre no interior do intestino médio do inseto vetor, formando gametas.

No intestino médio do inseto vetor, os gametócitos femininos se diferenciam em macrogameta e o masculino em microgameta através do processo de exflagelação. Os gametas femininos são fecundados pelos gametas masculinos formando um zigoto que sofre meiose completa e se transforma em uma estrutura invasiva móvel, denominada oocineto (28, 31). O oocineto atravessa a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio do mosquito, se alojando na membrana basal do órgão.

Dessa maneira, ele perde a motilidade e adquire uma nova forma, denominada oocisto. Inicia-se uma intensa multiplicação assexuada (esporogonia) dos parasitos, envolvendo a replicação do DNA e divisões nucleares no interior de cada oocisto, no qual é formado milhares de esporozoítos (32). Em aproximadamente duas semanas, a parede do oocisto maduro se rompe liberando os esporozoítos na hemolinfa do inseto, que podem migrar até as glândulas salivares, completando o ciclo evolutivo do *Plasmodium* (28, 33).

## 1.5 Diagnóstico laboratorial

Diagnósticos eficazes e práticos são de suma importância para o controle mundial da malária, uma vez que reduzem a transmissão, as complicações e a mortalidade da doença. A diferenciação entre os diagnósticos clínicos de outras infecções tropicais, com base na sintomatologia clínica dos pacientes, pode ser difícil. Dessa forma, diagnósticos confirmatórios usando tecnologias laboratoriais são imprescindíveis (34). O diagnóstico de malária é composto pelos dados clínicos e epidemiológicos do paciente somado ao diagnóstico laboratorial, através de exame microscópico para pesquisa do *Plasmodium* no sangue periférico, seja em gota espessa e/ou distensão sanguínea (35). Métodos alternativos também têm sido estudados e propostos por diferentes laboratórios em todo o mundo. Entre as propostas atualmente disponíveis existem os testes sorológicos, os testes rápidos (RDTs – Rapid Diagnostics Tests) e os protocolos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (*PCR, Polymerase Chain Reaction*) (36, 37). Desde 1990, o diagnóstico molecular baseado na PCR tem sido amplamente utilizado, através da detecção do DNA de plasmódios (38-40).

No Brasil, a gota espessa é o método oficialmente adotado para o diagnóstico de malária. Além de ser um método simples, eficaz e de baixo custo, esta técnica permite identificar a espécie de *Plasmodium* infectante, bem como quantificar a densidade parasitária. Quando realizada adequadamente, é considerada como padrão-ouro pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No entanto, métodos moleculares são mais sensíveis e específicos para detectar parasitas e podem ser utilizados em centros de referência para avaliar, inclusive, o desempenho da microscopia (41).



## **1.6 Estratégias de controle da malária**

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

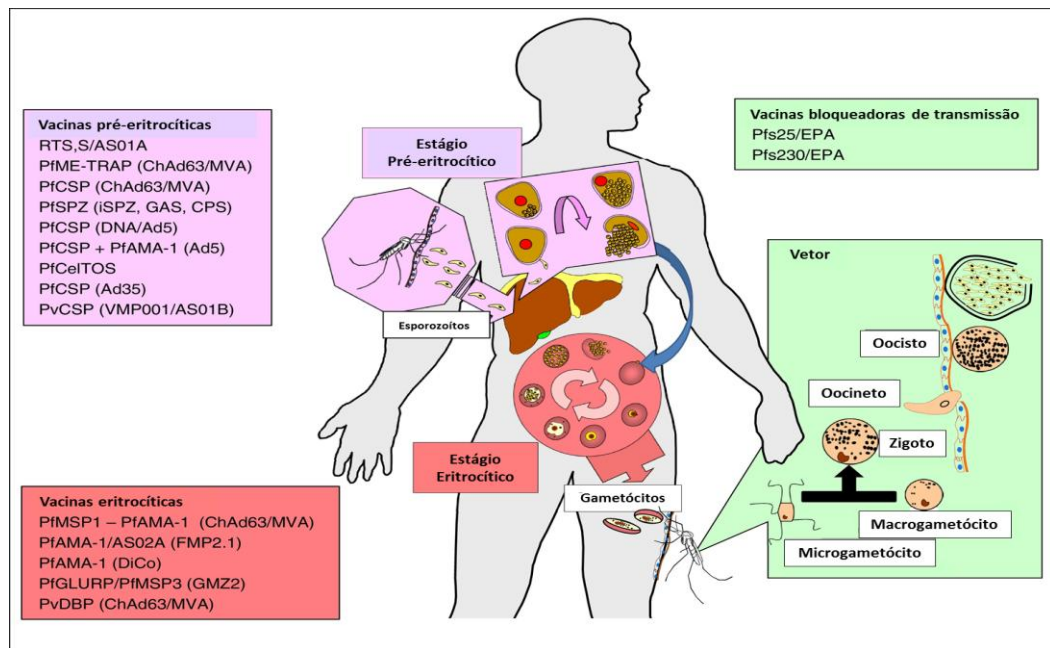
O tratamento adequado tanto previne a ocorrência de casos graves e fatais, como elimina fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença. Para cada espécie de *Plasmodium* é utilizado um medicamento ou associações de medicamentos específicos, em dosagens adequadas à situação particular de cada paciente. A OMS, bem como o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) estabelecem uma lista de fármacos e suas respectivas dosagens a serem administradas, sendo classificados de acordo com a sua natureza química. Na ausência de uma vacina, a ação terapêutica com o uso de drogas antimaláricas ainda se mantém como o principal instrumento de controle.

## **1.7 Antígenos candidatos vacinais de *Plasmodium vivax***

A grande maioria dos seres humanos é susceptível ao *P. vivax*, mesmo aqueles indivíduos que já contraíram a doença diversas vezes. Alguns fatores que influenciam na aquisição de imunidade são: a complexidade do ciclo biológico e a diversidade de antígenos envolvidos em cada estágio do parasito, o perfil de transmissão da malária na área, a maturidade do sistema imunológico e os mecanismos de resistência natural que diferem entre regiões e até mesmo entre populações de etnias distintas. Nesse sentido, embora a malária causada pelo *P. vivax* tenha sido considerada uma infecção branda e autolimitada até pouco tempo atrás, evidências crescentes demonstram que a mesma é clinicamente menos benigna do que tem sido comumente relatado (42). Recentemente, a espécie *P. vivax* tem sido implicada como responsável por muitos casos de malária grave, inclusive no Brasil (43, 44), podendo ainda levar a complicações incomuns e fatais

(45). Tais observações confirmam a importância de mais pesquisas sobre a etiopatogenia, tratamento e estratégias de controle. Dessa forma, é extremamente importante o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção para bloquear ou reduzir esta transmissão.

Apesar desta importância epidemiológica em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, a busca de vacinas contra o *Plasmodium vivax* é pouco explorada e o número de genes clonados que codificam para proteínas antígenicamente relevantes de *P. vivax* ainda são restritos. A “WHO Initiative for Vaccine Research” mantém uma lista atualizada de candidatas vacinais com base de dados inseridos pelas principais agências de fomento (46). Um progresso significativo em relação à vacina contra a malária, especificamente para *P. falciparum*, foi obtido nos últimos anos a partir de numerosos ensaios clínicos. Por outro lado, a pesquisa da vacina contra o *P. vivax* requer mais impulso e investigações adicionais que possibilitem a identificação de novos antígenos potencialmente vacinais (Figura 5) (47). Uma das razões principais desta dificuldade é a falta de um sistema *in vitro* para o cultivo contínuo, como estabelecido para *P. falciparum*. As dificuldades de manter o parasita em cultura se devem ao fato do *P. vivax* invadir preferencialmente, ou quase que exclusivamente, reticulócitos, os quais normalmente correspondem a apenas 1% da população total de eritrócitos no homem. Apesar dessas limitações, nos últimos anos um progresso significativo tem sido obtido na identificação e caracterização molecular e imunológica de várias proteínas candidatas a compor uma vacina.



**Figura 5** - Candidatos vacinais de malária em ensaios clínicos (47).

Adaptado e traduzido de Moreno *et al*, 2015. Cada estágio do ciclo de vida do *Plasmodium* é representado por cores, e as vacinas atuais direcionadas nas fases correspondem às cores do ciclo de vida. A representação esquemática não inclui as formas latentes do estágio hepático, conhecidas como hipnozoítos, produzidos durante o estágio pré-eritrocítico das infecções por *P. vivax* e *P. ovale*. Pf: *P. falciparum*; Pv: *P. vivax*.

A habilidade que o *Plasmodium* tem de primeiro reconhecer e, então, invadir os hepatócitos e as células sanguíneas, é fundamental para o desenvolvimento do seu ciclo de vida e também para a patogenia da doença. Nesse contexto, alguns antígenos localizados na superfície do parasita ou, especificamente, em suas organelas apicais têm sido caracterizados levando a uma melhor compreensão do ciclo de vida do *Plasmodium* e, conseqüentemente, a identificação de possíveis alvos que possam ser explorados em uma vacina contra o *P. vivax* (48). Dentre estes alvos, destacam-se antígenos pré-eritrocíticos, como a Proteína Circunsporozoíta (CSP) (49) e proteínas de estágio sanguíneo, tais como a Proteína de Superfície do Merozoíta 1 (MSP-1) (50, 51), a Proteína de Ligação ao Antígeno Duffy (DBP) (51, 52) e o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) (53).

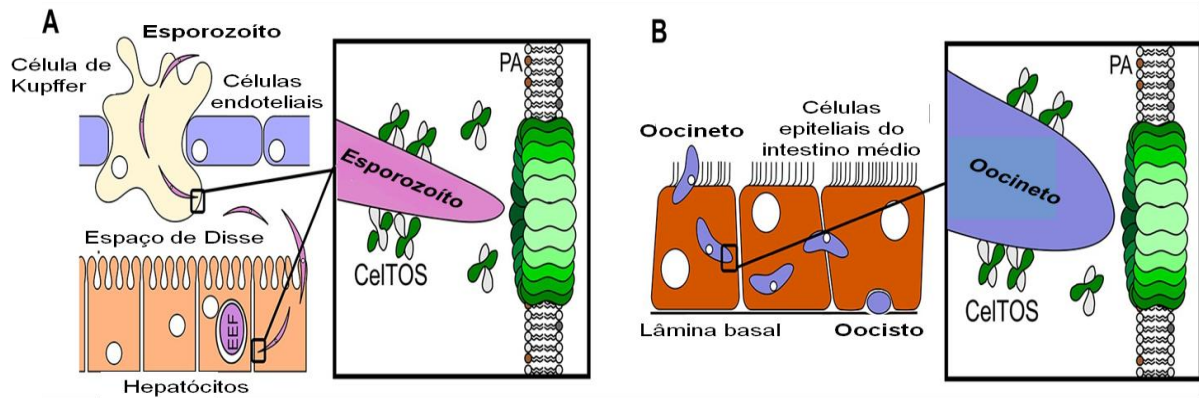
De fato, o envolvimento de antígenos de superfície na indução de uma resposta imune humoral protetora já foi amplamente descrito e atualmente vários autores têm considerado a CSP de *P. vivax* como o maior alvo para o desenvolvimento de vacinas, uma vez que esporozoítos irradiados, proteínas

recombinantes e até mesmo peptídeos sintéticos construídos a partir desta proteína induzem altos níveis de resposta imune humoral e produzem anticorpos que exibem a mesma especificidade gerada em infecções naturais (54-59). Todavia, em paralelo aos estudos com a CSP, iniciou-se uma fase de intensa busca na identificação de outras proteínas que fossem alvos potenciais de uma resposta protetora contra a malária. Algumas proteínas de esporozoítos, envolvidos na travessia celular e na migração subsequente de sinusóides do fígado, também passaram a ser exploradas para o desenvolvimento de vacinas (60).

### **1.8 CelTOS (Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites)**

A proteína denominada CelTOS (Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites), que medeia a invasão do *Plasmodium* à célula hospedeira, vem sendo considerada uma nova alternativa na busca de antígenos candidatos vacinais. Esta proteína é secretada por micronemas nos estágios invasivos nos hospedeiros, sendo importante no êxito da travessia celular realizada por esporozoítos e oocinetos (61). É altamente conservada entre alguns parasitos do Filo Apicomplexa e, curiosamente, possui semelhança estrutural com a glicoproteína gp41 de HIV-1 e com uma toxina formadora de poro da *Mycobacterium tuberculosis* (62).

Estudos já demonstraram que a interrupção de genes codificantes da CelTOS, em *P. berghei*, reduz a infectividade no mosquito hospedeiro e também a infectividade do esporozoíto no fígado, quase eliminando a sua capacidade de travessia celular (61). Recentemente, Jimah e colaboradores descobriram, através de cristalografia, que essa proteína se liga especificamente ao ácido fosfatídico, um lipídeo predominantemente encontrado no folheto interno das membranas plasmáticas. Eles mostraram também que a CelTOS tem a potencialidade de romper os lipossomas compostos de ácido fosfatídico através da formação de poros, o que permite a saída dos parasitas da célula hospedeira durante o percurso de travessia (Figura 6) (62).



**Figura 6** - Modelo para a CelTOS na passagem celular.

Adaptado e traduzido de Jimah *et al* 2016 (62). (A) Durante a fase pré-eritrocítica, os esporozoítos atravessam várias células de Kupffer e hepatócitos antes de invadir o hepatócito que será o seu local de desenvolvimento. A CelTOS forma poros e rompe as membranas celulares destas células para permitir a saída dos esporozoítos, de forma a concluir sua travessia. Essa ruptura ocorre através da ligação direta ao ácido fosfatídico (PA), no folheto interno, para criar um poro que permite a saída do esporozoito. EEF - forma exoeritrocitária. (B) No mosquito vetor, os oocinetos atravessam o epitélio do intestino médio do mosquito para atingir a lâmina basal, onde se desenvolvem em oocistos. A CelTOS realiza o mesmo procedimento de ruptura e formação de poro, assim como visto na etapa A.

A CelTOS foi identificada por análise genômica e funcional de proteínas expressas em estágios móveis do ciclo de vida do parasito *Plasmodium*. É uma proteína conservada entre as espécies (Figura 7), indicando que o gene *celtos* evoluiu de um ancestral comum de parasitas do gênero *Plasmodium* (61, 63). Nesse sentido, recentemente foi demonstrado pela primeira vez que a imunização com recombinantes de CelTOS de *P. falciparum* (PfCelTOS), em modelo murino, induz proteção cruzada contra a malária, causada pela espécie heteróloga *P. berghei* (64). Vale ressaltar que esta imunização com a sequência conservada da proteína CelTOS induziu uma significativa reatividade cruzada, tanto ao nível humoral, quanto celular. Através desse estudo, relatou-se pela primeira vez o potencial da CelTOS como um antígeno protetor. Verificou-se que uma resposta humoral anti-CelTOS seria capaz de inibir *in vitro* a invasão de esporozoítos em hepatócitos, bem como a motilidade do parasito, conferindo, dessa maneira, proteção (64, 65). Entretanto, tal reatividade cruzada não foi reportada em *P. vivax*. Acreditamos que uma das razões para essa ausência de reatividade pode ser o menor grau de similaridade entre a CelTOS de *P. falciparum* e *P. vivax* (63%) e, dessa forma, a presença de diferentes

aminoácidos nos epítomos identificados em *P. falciparum* pode ter reflexo na reatividade cruzada com *P. vivax*.

<i>P. berghei</i>	1	<u>MNKLTKLSVISSVF-VFFCFFNVLCCLRGKNGSEMSSFLEGGVSS</u>
<i>P. vivax</i>	1	<u>MNKVNRVSIICA-FLALFCFVNVLSLRGKSGSTASSSLEGGSEFS</u>
<i>P. falciparum</i>	1	<u>MNALRRLPVICS-FLVFLVFSNVLCFRGNNGHNSSSSSLYNGSQFI</u>
<i>P. berghei</i>	45	<u>NRIKKSLAS-FISESSSLDDIGNGLAETITNEIFSAFQODSSSFL</u>
<i>P. vivax</i>	45	<u>ERIGNSLSS-FLSESASLEVIGNELADNIANEIVSSLQKDSASFL</u>
<i>P. falciparum</i>	45	<u>EQLNNSFTSAFLESQ-SMNKIGDDLAETISNELVSVLQKNSPTFL</u>
<i>P. berghei</i>	89	<u>QTKFDIKKHAKKENAKKVLIEAIRLGLPEVEKIVAQSIQPPKVNRRH</u>
<i>P. vivax</i>	89	<u>QSGFDVKTQKATAKKVLVEALKAALPTTEKIVASTIKPPRVSED</u>
<i>P. falciparum</i>	89	<u>ESSFDIKSEVKKHAKSMLKELIKVGLPSFENLVAENVKPPKVDPA</u>
<i>P. berghei</i>	134	<u>TYSLVSPVVKALFNKIEEAVHKPVSNDNIWDYAGGDDEYE-ETEED</u>
<i>P. vivax</i>	134	<u>AYFLLGPVVKTLFNKVEDVLHKPIPDTIWEYESKGS-LEEEEAED</u>
<i>P. falciparum</i>	134	<u>TYGIIVPVLTSLFNKVETAVGAKVSDEIWNYNSPDVSESEESLSD</u>
<i>P. berghei</i>	178	NFDNDFFN
<i>P. vivax</i>	178	EFSDLLD
<i>P. falciparum</i>	179	DFFD----

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

A sequência de aminoácidos deduzida de PbCelTOS foi alinhada com a CelTOS de *P. falciparum* (PlasmoDB identificador PFL0800c) e *P. vivax*. Os resíduos conservados estão grifados em cinza. Os números de aminoácidos a partir do primeiro resíduo Met (metionina) estão mostrados à esquerda de cada linha; e a sequência de sinal N-terminal predita está sublinhada (61).

Corroborando com os resultados já existentes, também já foi demonstrado que peptídeos específicos da PfCelTOS podem estimular as células mononucleares de sangue periférico (CMSP), isoladas a partir de voluntários imunizados com esporozoítos irradiados, para produzir respostas antígeno-específicas com altos níveis de IFN- $\gamma$ , enfatizando o potencial impacto imunológico deste antígeno (66).

Kusi e colaboradores viram que a recombinante da PfCelTOS foi reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos de populações expostas que vivem em áreas de alta endemicidade da África (67). Por fim, um estudo de predição da reatividade das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> revelou vários epítomos distribuídos ao longo de toda a sequência de CelTOS, mas as análises funcionais *in vivo* feitas pela técnica ELISPOT indicaram que epítomos C-terminais eram mais imunogênicos (63). No entanto, todos esses trabalhos anteriores utilizaram a proteína CelTOS de *P. falciparum* e/ou *P. berghei*. Apesar de as propriedades antigênicas e imunogênicas da PfCelTOS, existem apenas duas descobertas recentes sobre o potencial

antigênico de sua homóloga em *P. vivax*, a PvCelTOS. Na primeira delas, foi demonstrado que anticorpos adquiridos naturalmente em indivíduos da Tailândia foram capazes de reconhecer a proteína recombinante (68). No Brasil, nosso trabalho mais recente (Anexo II) descreve pela primeira vez a imunogenicidade natural da PvCelTOS em indivíduos da Amazônia Brasileira, demonstrando que a baixa frequência de resposta mediada por anticorpos IgG contra a PvCelTOS é similar ao observado na Tailândia e que a proteína apresenta epítomos lineares de células B presentes na região N e C terminal. Os anticorpos citofílicos IgG1 são predominantes e podem estar associados a fatores de proteção (69).

Mesmo sendo essencial para a descrição do potencial da CelTOS como uma vacina candidata vacinal, não há dados publicados disponíveis na identificação do gene *pvceltos* em isolados brasileiros e na avaliação sobre a diversidade genética em áreas endêmicas de qualquer parte do mundo. De fato, a grande diversidade genética em populações naturais do parasita é um obstáculo importante para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o parasita da malária humana, uma vez que a diversidade antigênica limita a eficácia de imunidade protetora adquirida à malária (70). Apesar da diversidade genética, que é uma das características mais importantes das infecções pelo *P. vivax*, há uma escassez de informação sobre o polimorfismo do gene *celtos*. Tais dados têm importância em documentar alterações na diversidade genética e contribuir para intervenções de controle da malária no futuro.

## **1.9 Justificativa**

A diversidade antigênica pode limitar a eficiência da resposta imune naturalmente adquirida ou induzida. Portanto, a compreensão da diversidade genética do *Plasmodium* é essencial para o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos presentes no *P. vivax*. A proteína CelTOS vem sendo considerada uma nova alternativa na busca de antígenos candidatos vacinais. É uma proteína que está presente nos estágios invasivos do parasito no hospedeiro humano e no inseto vetor (61), possuindo um papel crítico e essencial no processo de travessia de esporozoítos e oocinetos na célula hospedeira, permitindo não somente a sua entrada, como também a sua saída durante o percurso (62). Trabalhos com a

proteína CelTOS já indicaram boas propriedades antigênicas e imunogênicas, demonstrando ser uma alternativa promissora em adição aos demais antígenos de esporozoítos já descritos. No entanto, não há trabalhos publicados sobre a diversidade genética da PvCelTOS. Além disso, o polimorfismo genético de candidatos a vacinas de *P. vivax* tem sido pouco discutido entre áreas endêmicas brasileiras, que possui uma transmissão instável. Dessa forma, considerando que a epidemiologia da malária no Brasil apresenta uma transmissão instável e o conhecimento sobre o polimorfismo genético da PvCelTOS permanecem desconhecidos, a identificação e a caracterização molecular dessa proteína em isolados brasileiros serão uma adição significativa ao campo das pesquisas de vacinas contra o *P. vivax*. Portanto, no presente trabalho nos propusemos a identificar o gene *pvceltos* nos isolados de diferentes regiões da Amazônia Brasileira e estudar os possíveis impactos da diversidade genética da PvCelTOS em estruturas de proteínas e epítomos potenciais através de ferramentas de bioinformática.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar a variabilidade do gene que codifica a PvCelTOS em isolados brasileiros e verificar os potenciais impactos do polimorfismo nos epítomos e na estrutura tridimensional, preditos *in silico*.

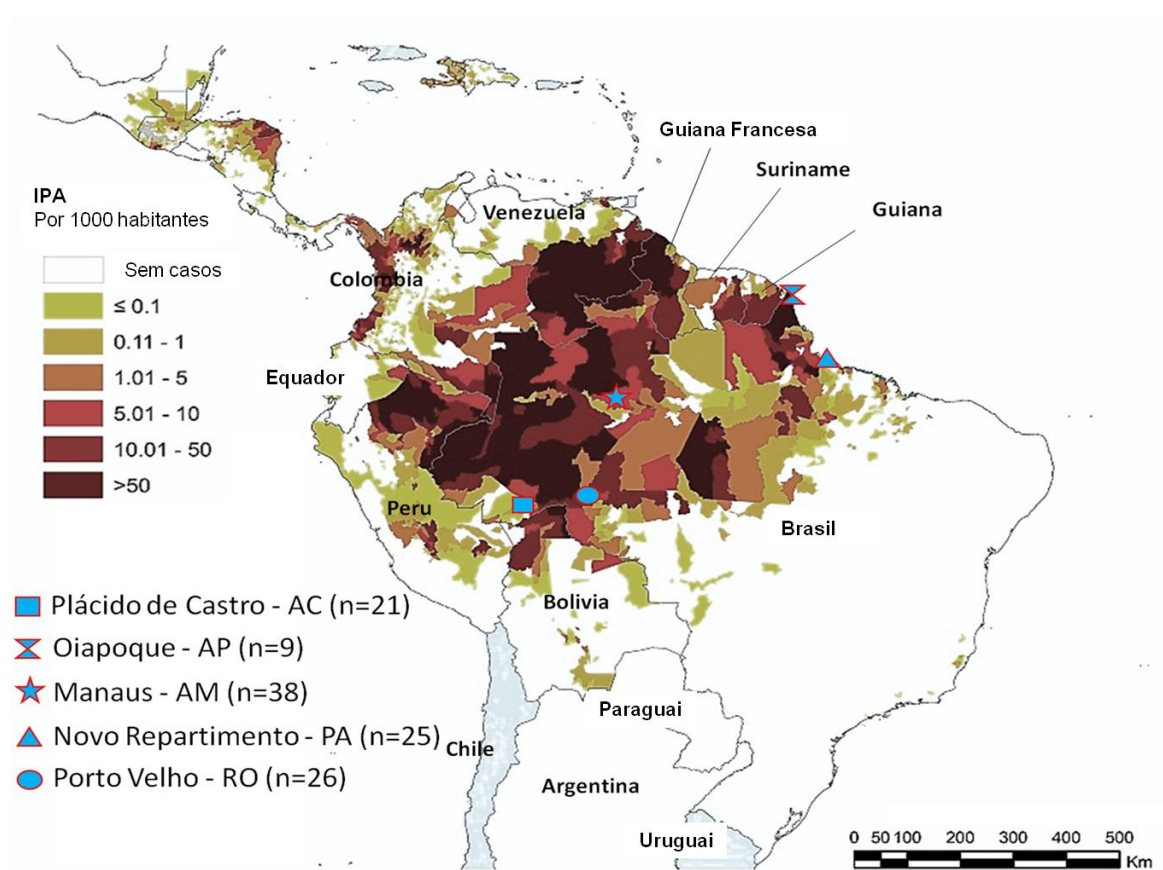
### 2.2 Objetivos específicos

- Desenhar e validar iniciadores específicos (*primers*) para a PvCelTOS;
- Caracterizar a PvCelTOS em isolados brasileiros a partir da técnica de amplificação por PCR;
- Avaliar o polimorfismo genético da PvCelTOS nos isolados através da reação de sequenciamento;
- Realizar a predição *in silico* dos possíveis epítomos presentes na proteína;
- Avaliar os possíveis impactos da diversidade genética da PvCelTOS na estrutura da proteína.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo e coleta de amostras

A maioria dos casos de malária no Brasil está concentrada na Amazônia, uma área endêmica para a doença (6). Diante desse cenário, o estudo foi realizado em cinco regiões diferentes da Amazônia Brasileira (Figura 8). Um total de 119 amostras de sangue de indivíduos infectados pelo *P. vivax* foi utilizado neste estudo, sendo 21 indivíduos de Plácido de Castro, 9 indivíduos de Oiapoque, 25 indivíduos de Novo Repartimento, 26 indivíduos de Porto Velho e 38 indivíduos de Manaus.



**Figura 8** - Mapa geográfico mostrando os cinco locais de estudo e a respectiva Incidência Parasitária Anual (IPA).

Fonte: SIVEP-Malária.

### **3.2 Descrição das áreas de estudo**

A cidade de Plácido de Castro (PLC) se localiza a 90 km da capital do Estado do Acre, Amazônia Ocidental Brasileira. Possui uma população de 17.334 mil habitantes (16% acima da idade de 18 anos), com uma área territorial de 2.047 km<sup>2</sup>. Está situada a 153 metros do nível do mar, apresentando uma latitude de -09° 58' 29" e longitude de 67° 48' 36". Nessa cidade, as principais atividades econômicas são a pecuária, a extração de borracha e a agricultura. Além disso, é um lugar que possui a transmissão ativa da malária durante todos os períodos do ano.

O município de Oiapoque (OIP) está localizado no Estado do Amapá, no leste da Amazônia Brasileira. Possui uma área de mineração de ouro, com uma população de 17.423 mil habitantes, apresentando uma latitude de 03° 49' 58" e longitude de 51° 49' 51". Possui transmissão ativa de malária, promovido principalmente pelo intenso fluxo migratório.

Manaus (MAO), a capital do Estado do Amazonas, está localizada na Região Norte do Brasil. Possui uma população de mais de 2 milhões, sendo considerada a cidade mais populosa do estado do Amazonas, apresentando uma latitude de -03° 06' 07" e longitude de 60° 01' 3". A transmissão da malária é mais comum em áreas rurais e semi-rurais, podendo ocorrer também em áreas urbanas, principalmente na periferia.

A cidade do Novo Repartimento (NR) está situada a 600 km de Belém, capital do Estado do Pará, no leste da Amazônia Brasileira. Possui um total de 47.197 mil habitantes, com uma área territorial de 11.407 km<sup>2</sup>. Está situada a 460 metros do nível do mar, apresentando latitude de 04° 19' 5" e longitude 49° 47' 47". Suas principais atividades econômicas são: pecuária, comércio de produtos agrícolas e manufaturados. Apresenta-se com uma transmissão ativa de malária no período de janeiro a dezembro, com cerca de 2.000 casos alóctones e autóctones.

O município de Porto Velho (PVL), capital do Estado de Rondônia, está localizado na Amazônia Ocidental Brasileira. Possui uma população de 360.068 mil habitantes (16% com idade acima de 18 anos), com uma área territorial de 34.082 km<sup>2</sup>. Está situada a 85 metros do nível do mar, apresentando uma latitude de -08° 45' 43" e longitude de 63° 45' 43", onde as principais atividades econômicas são a

pecuária, a extração de borracha, a exploração de madeira e a agricultura. A transmissão ativa de malária ocorre durante todos os períodos do ano.

A distância entre as localidades estudadas está demonstrada na

### Tabela 1.

**Tabela 1** - Distância em km entre os cinco locais de estudo.

Localidade	Distância (km)			
	OIP	MAO	NR	PVL
MAO	1.196	-	-	-
NR	938	1.143	-	-
PVL	1.939	760	1.635	-
PLC	2.313	1.119	2.024	393

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

### 3.3 Exame microscópico direto para o diagnóstico de malária

A infecção por *P. vivax* foi diagnosticada por exame microscópico de distensão sanguínea corada pelo Giemsa (Sigma Chemical CO, St Louis, EUA). Somente pacientes infectados com *P. vivax* foram inscritos, de acordo com os seguintes critérios: procuraram assistência médica para os sintomas clínicos de malária, apresentaram sintomas de malária sem complicações, eram maiores que 18 anos de idade e tinham um diagnóstico positivo de *P. vivax*. As mulheres grávidas, os pacientes menores de 18 anos de idade e os indivíduos infectados com *P. vivax* e *P. falciparum* (infecção mista) foram excluídos do estudo. Foram examinadas distensões sanguíneas e gota espessa para a identificação do parasita da malária por um técnico com experiência em diagnóstico. As lâminas foram coradas com Giemsa, e um total de 200 campos microscópicos foi examinado sob uma ampliação

de mil vezes. Para confirmar o diagnóstico, análises moleculares utilizando iniciadores específicos para o gênero *Plasmodium* sp. e para espécies (*P. falciparum* e *P. vivax*) foram realizadas em todas as amostras (71). Os doadores positivos para *P. vivax* e/ou *P. falciparum* no momento da coleta de sangue foram subsequentemente tratados pelo regime quimioterapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde.

### **3.4 Aspectos éticos da pesquisa**

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de cada localidade, que incluiu obter o consentimento do paciente para o uso de suas amostras de sangue para pesquisa: Belém (Novo Repartimento/PA): 68.473-970; Porto Velho (CEPEN): 76.812-329; Rio Branco (Hospital Geral de Plácido de Castro/AC): 69.928-000; Oiapoque (Hospital Municipal do Oiapoque/AP): 68.980-000; Manaus (CEP-FIOCRUZ): 346-613. O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os doadores adultos. Todos os procedimentos adotados neste trabalho cumpriram plenamente as licenças federais específicas emitidas pelo Ministério da Saúde.

### **3.5 Extração do DNA**

O DNA foi extraído de amostras de sangue, utilizando o kit QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi (QIAGEN, Hilden, Germany). Aproximadamente 1 mL de concentrado de hemácias, de cada amostra, previamente descongelada a temperatura ambiente (TA), foi adicionado em um tubo do tipo falcon de 15 mL. Em seguida, 100 µL de protease (QIAGEN) foi adicionado e o tubo foi levemente homogeneizado. Logo após, foi acrescentado 1,2 mL do tampão AL (QIAGEN) e o tubo foi homogeneizado manualmente, por inversão, durante 15 segundos, seguindo-se uma vigorosa agitação por pelo menos 1 minuto. A mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto (96% - 100%) (Sigma) à amostra e o mesmo procedimento de homogeneização foi realizado. A solução (já lisada) assim obtida foi, então, aplicada cuidadosamente na coluna (acoplado em um tubo falcon coletor de 15 mL), a qual foi submetida à

centrifugação a 5000 rpm (1850 x g) por 4 minutos (TA). O filtrado foi descartado e a coluna foi acoplada em um novo tubo coletor de 15 mL. Foi adicionado, então, 2 mL de tampão AW1 (QIAGEN) na coluna, seguindo-se de uma centrifugação de 5000 rpm por 2 minutos sem freio (TA). Novamente o filtrado foi descartado e a coluna foi acoplada em um novo tubo coletor de 15 mL, no qual foram adicionados 2 mL de tampão AW2 (QIAGEN), seguida de uma nova centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos (TA). Após o descarte do filtrado, a coluna foi transferida para um novo tubo do tipo falcon de 15 mL e, posteriormente, foi acrescentado 200 µL de tampão AE (QIAGEN) diretamente no centro da membrana. A coluna foi então, incubada por 5 minutos (TA) e, finalmente centrifugada a 5000 rpm por 2 minutos (TA). O filtrado contendo o DNA isolado foi coletado e armazenado em um tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL previamente identificado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

### **3.6 Desenho dos iniciadores específicos (*primers*) da PvCelTOS**

O gene *celtos* é conservado entre diferentes espécies de *Plasmodium* e para se obter os iniciadores específicos (*primers*) foi utilizada a sequência referência de *P. vivax* Salvador-1 (Sal-1, origem El Salvador) depositada no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), com número de acesso: AB194053.1. Todos os oligonucleotídeos foram verificados quanto à especificidade utilizando a ferramenta Primer-BLAST fornecido pelo NCBI através do site: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). O iniciador senso (5' – CCCCCAAAGGCAAATGAACAA - 3') correspondeu à posição 20 a 41 da sequência do gene *pvceltos* e o iniciador anti-senso (5' – AACTCATCTTCAGCTTCTTCCTC - 3') correspondeu à posição 569 a 547. Posteriormente, os iniciadores específicos foram sintetizados quimicamente para realizar a reação de PCR e o sequenciamento de DNA.

### **3.7 Reação de Polimerização em Cadeia / Polymerase Chain Reaction (PCR) do gene *pvceltos***

O gene *pvceltos* foi amplificado pelo método de PCR convencional, utilizando o par de iniciadores específicos: PvCelTOS 5' - CCCCCAAAGGCAAATGAACAA - 3'

(senso) e PvCelTOS 5' - AACTCATCTTCAGCTTCTTCCTC - 3' (anti-senso). A amplificação do gene *pvceltos* foi realizada com um volume final de reação de 25  $\mu$ L usando um 1  $\mu$ L de DNA, 10 pmol/ $\mu$ L de cada iniciador e o kit Master Mix (Promega) contendo a DNA Taq polimerase, tampão de PCR (Qiagen) e dNTPs (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados). As reações de PCR convencional foram realizadas utilizando o termociclador PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystem) e as condições de ciclagem foram as seguintes: primeira etapa de 95°C durante 2 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 57°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto e; a última etapa com uma ciclagem de 72°C durante 1 minuto. Em todas as reações foram utilizados dois controles negativos (um sem DNA e outro com DNA extraído a partir de cultura *in vitro* de *P. falciparum*) e um controle positivo (amostra infectada de *P. vivax*). Para confirmar a presença de DNA da cultura *in vitro* de *P. falciparum* e que a falta de amplificação é devida à especificidade dos iniciadores para PvCelTOS, realizou-se uma amplificação do fragmento do gene P126 de *P. falciparum*, como previamente descrito por Pratt-Riccio (72).

Um volume de 5 $\mu$ L do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 2% (Sigma) diluído em tampão TAE 1x (Tris-acetato 0,04, EDTA 1 mM) na presença de GelRed (Biotium, CA, EUA) e submetidos à eletroforese horizontal por aproximadamente 1 hora à corrente elétrica de 100 V constantes. Posteriormente, os produtos foram visualizados por iluminação de ultravioleta (UV). O dimensionamento dos produtos foi realizado utilizando um marcador de 100 pares de base (pb) (Thermo Scientific).

### **3.8 Purificação dos produtos de PCR**

Antes de serem sequenciados, os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit GE Healthcare Lifesciences com o objetivo de retirar eventuais inibidores da reação para que não ocorra prejuízo no sequenciamento gênico.

De acordo com o protocolo de reação, foram adicionados 200 $\mu$ L de tampão de captura para 50 $\mu$ L do produto de PCR e homogeneizado, cada um em seu respectivo tubo. Logo após, a solução foi inserida em uma coluna (com o eppendorf) e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foi centrifugada

a 14.000 rpm por 1 minuto. O líquido sobrenadante do eppendorf foi descartado e recolocado na coluna no mesmo eppendorf. Foi adicionado 500µL do tampão de lavagem e centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto. Novamente o líquido do eppendorf foi descartado e, logo depois, a coluna foi colocada no tubo coletor (livre de DNase). Foram adicionados 50µL de tampão de eluição e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 RPM por 3 minutos. Por fim, a coluna foi descartada e tubos com os produtos purificados foram armazenados no freezer.

### **3.9 Reação de sequenciamento do DNA**

A especificidade do ensaio de PCR foi confirmada por sequenciamento dos produtos de PCR a partir de todas as amostras positivas utilizando um kit de sequenciamento *Big Dye Terminator Cycle Ready Reaction* version 3.1 (Applied Biosystems), previamente padronizado pela plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (PDTIS/Fiocruz).

De acordo com o protocolo de reação do sequenciamento, adicionou-se a cada poço de uma placa de 96 poços (Applied Biosystems) um volume de 2 µL de DNA (cerca de 15 ng/µL), 1 µL de iniciador (3,2 pmol/µL dos mesmos iniciadores específicos utilizados na PCR) e água MilliQ, totalizando um volume final 7,5 µL por poço. A mistura para a reação de sequenciamento de DNA foi calculada 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 (tp) 5x (Applied Biosystems). Assim, foi adicionado 2,5 µL da mistura de reação em cada poço da placa (1 µL de BigDye + 1,5 de tp 5x) e, logo após, a placa foi centrifugada brevemente (spin). No termociclador foi utilizado o seguinte protocolo: 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos; 40 repetições desse mesmo ciclo.

Após a reação de sequenciamento foi feita uma precipitação das amostras para a retirada de ddNTPs livres que poderiam interferir na leitura da sequência de DNA no analisador. A precipitação do DNA foi feita com a adição de 30 µL de isopropanol 75% (Merck) em cada poço da placa, seguindo-se de uma incubação



por 15 minutos ao abrigo da luz e centrifugação por 45 minutos a 4000 rpm. O isopropanol foi retirado por inversão da placa num papel absorvente. Posteriormente, foram acrescentados 50 µL de etanol 60% (Merck) e novamente a placa foi centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm. Ao final, o sobrenadante foi descartado, de acordo como descrito anteriormente, e a placa foi novamente centrifugada, invertida em uma toalha de papel, até chegar a 600 rpm. O sedimento de DNA obtido foi colocado para secar no termociclador a 60°C por 10 minutos. Em seguida, a placa foi armazenada no freezer envolta em papel alumínio até o momento da leitura no sequenciador.

Para leitura da placa no sequenciador, foi adicionado ao DNA 10 µL de formamida Hi-Dye (Applied Biosystems) em cada poço da placa seca. Em seguida, a placa foi levada para secar no termociclador a 95°C por 3 minutos e, posteriormente, colocada no gelo por 5 a 10 minutos. Após o choque térmico, a placa foi centrifugada brevemente (spin), para permitir que os produtos aderidos às paredes dos tubos dos poços concentrem-se ao fundo, e conduzida para leitura na plataforma de sequenciamento capilar automático de DNA ABI Prism® DNA Analyzer 3730xl (Applied Biosystems) da Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (PDTIS/Fiocruz).

### **3.10 Análise do polimorfismo**

As sequências nucleotídicas obtidas (senso e anti-senso) para cada amostra foram analisadas utilizando programas provenientes do pacote DNASTAR/Lasergene Software (Madison, WI). O programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – NCBI) foi utilizado para verificar a similaridade e identificar os polimorfismos em relação à sequência de referência Sal-1 depositada no NCBI. O alinhamento da sequência consenso com a sequência de referência foi realizado com o auxílio do programa *MegAlign 7.0.0* (DNASTAR/Lasergene Software) utilizando o algoritmo do programa *Clustal X2*, sendo feito um ajuste manual através do programa *EditSeq 7.0.0* (DNASTAR/Lasergene Software). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. O número de sítios segregantes (S), que depende do tamanho da amostra e do comprimento das sequências, o número de haplótipos (H), a diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) e a diversidade de haplótipos foram realizados em

colaboração com o Dr. Gustavo Capatti Cassiano e calculados utilizando *DnaSP v5* (73). O Teste D de Tajima's (74), para determinar a saída das predições da teoria neutra da evolução, foi também estimado com o programa *DnaSP V5*. A diferenciação genética entre populações foi investigada avaliando a taxa de fixação ( $F_{ST}$ ) pela análise da variância molecular (AMOVA) implementado em Arlequin v3.5.2.2 (75) e as significâncias foram estimadas usando 10.000 permutações. O nível de significância foi ajustado pela correção de Bonferroni para testes múltiplos.

### **3.11 Modelo 3D e análise eletrostática da PvCeITOS**

A estrutura 3D da PvCeITOS foi predita usando o algoritmo *Robetta* (76) em colaboração com o Dr. João Hermínio Martins da Fiocruz-CE. A sequência de aminoácidos foi adquirida a partir do banco de dados NCBI, pelo número de Acesso: AB194053.1. O *Robetta* é um algoritmo automatizado para predições da estrutura 3D de proteínas através de modelagem *ab initio* e comparativa. O primeiro passo é a pesquisa de homólogos estruturais usando BLAST (77) ou PSI-BLAST (78). Na sequência da proteína, a estrutura primária alvo é dividida em domínios separados, ou unidades de dobramentos independentes de proteínas, comparando a sequência com as famílias estruturais na base de dados Pfam (79). Os domínios com estruturas homólogas seguem um padrão baseado em um protocolo de modelagem. As cinco estruturas finais são selecionadas tomando os modelos de energia mais baixa conforme determinado pela função de energia de Rosetta. A superfície eletrostática foi calculada com o software *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS) (80) integrado com o programa *Pymol*. O software APBS resolve a equação de Poisson-Boltzmann para descrever interações eletrostáticas entre soluto em solução aquosa. A eletrostática contínua desempenha um papel muito importante na determinação da cinética de ligante-proteína e proteína-proteína.

### **3.12 Predição *in silico* de epítomos de células B e células T**

Os parâmetros como a acessibilidade, exposição na superfície, polaridade e propensão antigênica de cadeias polipeptídicas têm sido frequentemente correlacionadas com a localização de epítomos contínuos. Isto levou a uma busca na

identificação e utilização de padrões de reconhecimento que permitiriam que a posição de epítomos contínuos pudesse ser prevista a partir das características da sequência de uma proteína alvo.

A predição de epítomos lineares de células B foi realizada utilizando o programa BepiPred em colaboração com o Msc. Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva (81). Este software tem uma única sequência no formato FASTA e cada aminoácido recebe uma pontuação predita com base em perfis do modelo de Hidden Markov de antígenos conhecidos, e incorpora métodos de escala de propensão com base na hidrofobicidade e predição de estrutura secundária. Para cada sequência de entrada do servidor é gerado um escore de predição. As posições dos epítomos de células B lineares são preditos para serem localizados nos resíduos com as pontuações mais altas. De forma a considerar uma dada região como um epítomo linear de células B válido para PvCelTOS, o valor de cut-off de 0,35 foi utilizado para justificar os valores semelhantes de especificidade (0,75) e a sensibilidade (0,49). Portanto, a pontuação do epítomo representa a média das pontuações de pelo menos oito aminoácidos consecutivos acima do cut-off e, dessa forma, as sequências com valores médios mais elevados foram escolhidos como epítomos lineares potenciais.

A ligação diferencial de epítomos de células T abrangendo a sequência completa da PvCelTOS foi feita em 18/04/2016 utilizando o IEDB (*Immune Epitope Database and Analysis Resource*), como ferramenta de análise (82) somado ao ANN aka NetMHC (3.4) (83, 84), SMM (85) e Comblib (86). Considerando o comprimento de 9 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.

### **3.13 Análise estatística**

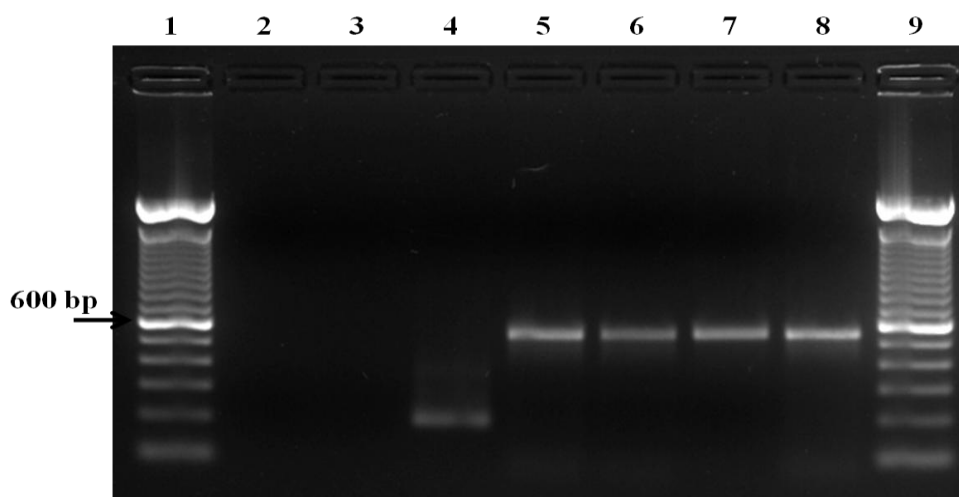
O teste de Kolmogorov-Smirnoff foi utilizado para determinar se a variável foi distribuída normalmente. As diferenças na proporção de frequências haplótipos entre as localidades estudadas foram avaliadas pelo teste de *Fisher* usando Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, Inc.).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização molecular da PvCelTOS nas regiões estudadas

#### 4.1.1 Amplificação do gene PvCelTOS na PCR

A fim de identificar o gene que codifica a PvCelTOS em isolados de áreas endêmicas brasileiras, 119 amostras de sangue de indivíduos infectados residentes nas cidades de Porto Velho, Plácido de Castro, Manaus, Novo Repartimento e Oiapoque tiveram o DNA extraído e submetido ao diagnóstico molecular por PCR. Os iniciadores foram desenhados a partir do programa Primer-BLAST, e posteriormente à análise de PCR, o gel de agarose revelou a amplificação em 100% das amostras. Todos os isolados de campo apresentaram apenas um tipo de fragmento correspondente a 550 pares de base (pb). Em adição, amostras de *P. falciparum* também foram testadas, mas foram negativas para a amplificação por PCR do gene *pvceltos* (Figura 9). Portanto, as 119 amostras de indivíduos infectados com *P. vivax* amplificado por PCR foram sujeitas a reações de sequenciamento, a fim de identificar os possíveis polimorfismos de um único nucleotídeo do gene que codifica a PvCelTOS.



**Figura 9** - Amplificação por PCR do gene *pvceltos*.

Gel de agarose mostrando o tamanho do fragmento dos produtos de PCR. **Linha 1:** marcador molecular de 100 pb; **Linha 2:** controle negativo (água); **Linha 3:** cultura *in vitro* de *P. falciparum* (amplificação com iniciadores da PvCelTOS); **Linha 4:** cultura *in vitro* de *P. falciparum* (amplificação com iniciadores da p126); **Linha 5:** controle positivo da reação de PCR (amostra infectada com *P.*

*vivax*); **Linhas 6, 7 e 8:** amostras de pacientes infectados por *P. vivax*; **Linha 9:** marcador molecular de 100 pb.

#### **4.1.2 Polimorfismo genético da PvCelTOS em isolados brasileiros através da reação de sequenciamento**

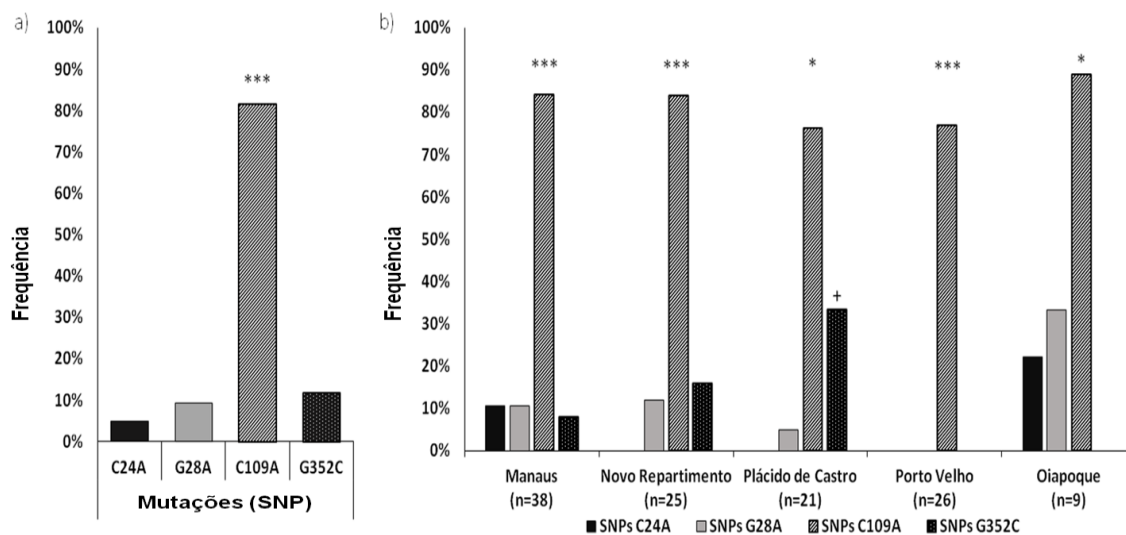
Utilizamos a sequência referência de *P. vivax* Salvador-1 (Sal-1), disponível no banco de dados do PubMed para alinhar o gene que codifica a PvCelTOS com as sequências gênicas amplificadas dos isolados das diferentes regiões brasileiras.

Todos os isolados estudados apresentaram um alto grau de similaridade quando comparados à cepa referência (99,3%). No entanto, a partir dos 550 pb sequenciados e alinhados, quatro bases de nucleotídeos (0,7%) apresentaram mutações de um único nucleotídeo em 4 posições específicas (24, 28, 109 e 352), como mostrado na Tabela 2. Interessantemente, todos os SNPs estiveram presentes em, pelo menos, dois isolados e duas localidades da população de estudo. Mesmo com o elevado grau de conservação da sequência do gene *pvceltos*, 85% dos isolados estudados apresentaram pelo menos um SNP em relação à sequência referência. Conforme foi demonstrada na Figura 10a, a mutação sinônima C109 esteve presente em 82% dos isolados estudados e foi significativamente mais elevada do que todas as outras 3 mutações ( $p < 0,0001$ ), enquanto que a outra mutação sinônima C24A foi menos frequente. Apenas duas mutações não sinônimas foram encontradas, G28A e G352C, as quais representam a substituição de glicina por serina e valina por leucina, respectivamente, apresentando uma frequência de 9,2% e 11,7% nas posições 28 e 352, respectivamente. Em relação às áreas endêmicas estudadas, a maior frequência observada de C109A foi mantida em todas as localidades (Figura 10b). Manaus apresentou alta diversidade, apresentando todas as 4 mutações dentre as 38 amostras, enquanto Porto Velho apresentou a menor diversidade, apresentando apenas a mutação sinônima C109A. Por fim, nos isolados de Plácido de Castro, a mutação não sinônima G352C também foi significativamente maior que G28A ( $p = 0,0480$ ), enquanto em todas as demais localidades essa predominância não ocorreu.

**Tabela 2** - Mutações encontradas no gene *pvceltos*: posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos.

Sequências	Posição do nucleotídeo			
	22 a 24	28 a 30	109 a 111	352 a 354
Gene selvagem	<u>CCC</u>	<u>GGC</u>	<u>CGG</u>	<u>GTG</u>
Mutante	-- A	A --	A --	C --
	Posição do aminoácido			
	8	10	37	118
Gene selvagem	Prolina	Glicina	Arginina	Valina
Mutante	-	Serina	-	Leucina

O símbolo: -- significa que não há troca de nucleotídeo. E o símbolo: - significa que não há substituição de aminoácido.



**Figura 10** - Análise da diversidade genética da PvCelTOS nos isolados de *P. vivax*.

(A) O gráfico representa a frequência das quatro mutações nas posições específicas de pb (24, 28, 109 e 352). (B) O gráfico representa a frequência de mutações em isolados de cada localidade estudada. (\*) Indica que as diferenças entre a frequência de SNP C109A foi maior do que outras mutações e (+) indica que a frequência de SNP G352C foi maior do que a frequência do SNP G28A por Fisher. (\*):  $p < 0.05$ ; (\*\*):  $p < 0.01$ ; (\*\*\*):  $p < 0.0001$ .

## 4.2 Frequência de haplótipos encontrada na população de estudo

Apenas 18 isolados (15%) mantiveram as suas sequências idênticas à cepa referência nas posições 24, 28, 109 e 352 (H1=CGCG). Nos outros isolados, as mutações resultaram em 9 haplótipos diferentes (H2=AGCG; H3=CACG; H4=CGAG; H5=CAAG; H6=CGAC; H7=AGAG; H8=CAAC; H9=AAAG), que estão representados na (Tabela 3). Dentre todos os isolados estudados, o haplótipo H4 apresentou a maior frequência e foi significativamente maior comparado à referência do H1 ( $p < 0,0001$ ). Por outro lado, H2 ( $p < 0.0001$ ), H3 ( $p = 0.0002$ ), H5 ( $p = 0.0328$ ), H7 ( $p = 0.0028$ ), H8 ( $p < 0.0001$ ) e H9 ( $p < 0.0001$ ) apresentaram uma menor frequência quando comparado com H1. No entanto, nós observamos que o haplótipo H1 e o H4 estão presentes em todas as localidades, enquanto H2, H8 e H9 foram detectados em apenas uma localidade (Manaus, Novo Repartimento e Oiapoque, respectivamente). Manaus e Novo Repartimento apresentaram a maior diversidade entre os isolados, com 6 haplótipos, enquanto Porto Velho apresentou a menor diversidade, possuindo apenas 2 haplótipos, que são comuns a todas as localidades (H1 e H4). Curiosamente, apesar de um menor número de isolados analisados, Oiapoque apresentou uma grande diversidade na sequência do gene *pvcelts* com cinco haplótipos, enquanto quatro haplótipos diferentes foram detectados em Plácido de Castro. Não foi possível analisar os haplótipos em clados confiáveis, devido à elevada similaridade entre as sequências das diferentes origens geográficas.



**Tabela 3** - Distribuição dos haplótipos da PvCelTOS entre as cinco localidades estudadas da Amazônia Brasileira.

Localidades	Haplótipos PvCelTOS - n (%)								
	(Posições dos nucleotídeos: 24, 28, 109 e 352).								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
	(CGCG)	(AGCG)	(CACG)	(CGAG)	(CAAG)	(CGAC)	(AGAG)	(CAAC)	(AAAG)
Manaus (n=38)	<b>5 (13.1%)</b>	1 (2.6%)	-	22 (57.8%) ***	4 (10.5%)	3 (7.9%)	3 (7.9%)	-	-
Novo Repartimento (n=25)	<b>3 (12%)</b>	-	1 (4%)	16 (64%) ***	1 (4%)	3 (12%)	-	1 (4%)	-
Plácido de Castro (n=21)	<b>3 (14.3%)</b>	-	1 (4.8%)	10 (47.6%)*	-	7 (33.3%)	-	-	-
Porto Velho (n=26)	<b>6 (23.1%)</b>	-	-	20 (76.9%) ***	-	-	-	-	-
Oiapoque (n=9)	<b>1 (11.1%)</b>	-	-	4 (44.4%)	2 (22.2%)	-	1 (11.1%)	-	1 (11.1%)
<b>Total (n=119)</b>	<b>18 (15.1%)</b>	1 (0.8%)***	2 (1.7%) ***	72 (60.5%) ***	7 (5.9%) *	13 (10.9%)	4 (3.4%) **	1 (0.8%) ***	1 (0.8%) ***

Os valores representam o número e a frequência (%) dos haplótipos encontrados em cada localidade estudada. H1 representa a sequência referência (cepa Sal-1) e H4 representa a sequência consenso. (\*) Indica que as diferenças entre as frequências de haplótipos mutados e de sequência referência (H1) foram significativas pelo teste exato de Fisher. (\*):  $p < 0.05$ ; (\*\*):  $p < 0.01$ ; (\*\*\*):  $p < 0.0001$

### 4.3 Análise genética da população

Nós sequenciamos o gene *pvceltos* (posições 19-569) de 119 amostras coletadas de cinco áreas da Amazônia Brasileira. A partir do alinhamento com a sequência referência (Sal-1), quatro SNPs distintos foram identificados. Dois SNPs foram sinônimos (C24A e 109A) e dois não sinônimos (G28A e G352C). Dois destes polimorfismos (C24A e G28A) não tinham sido descritos previamente. A diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) para *pvceltos* de 119 sequências analisadas foi  $0,00141 \pm 0,00014$  (Tabela 4). A maior diversidade de nucleotídeos foi observada no grupo Oiapoque ( $0,00202 \pm 0,00044$ ), seguida pelo grupo Plácido de Castro ( $0,00161 \pm 0,00029$ ). Entre as 5 populações, as sequências de Porto Velho apresentaram a menor diversidade de nucleotídeos ( $0,00067 \pm 0,00017$ ) como esperado, uma vez que apenas um SNP foi detectado neste grupo. Da mesma forma, os isolados de Oiapoque apresentaram a maior estimativa da diversidade de haplótipos ( $H_d$ ) ( $0,806 \pm 0,014$ ), enquanto que os isolados de Porto Velho apresentaram o menor  $H_d$  ( $0,369 \pm 0,091$ ). A diversidade de haplótipos foi semelhante entre as demais áreas estudadas (Tabela 4). O teste D de Tajima foi realizado para avaliar se existe uma pressão seletiva no gene *pvceltos*. Embora os valores do Tajima variassem entre -0,279 e 0,699, os testes não mostraram desvios significativos em relação à neutralidade em todas as áreas estudadas, indicando não haver seleção significativa no gene *pvceltos* (Tabela 4).

As comparações entre pares de cada população de parasitas foram realizadas utilizando-se as estatísticas da  $F_{ST}$  para verificar se havia indicação de diferenciação genética entre populações, mas todos os valores de  $F_{ST}$  não eram significativos, sugerindo uma ausência de diferenciação genética entre as populações estudadas (Tabela 5).

**Tabela 4** - Comparação da diversidade genética entre os isolados da Amazônia Brasileira.

	Número de sítios segregantes (S)	Número de haplótipos	Diversidade haplotípica ( $H_d$ )	Diversidade nucleotídica ( $\pi$ )	Teste Tajima
<b>Novo Repartimento</b>	3	6	0.58	0.00142	-0.045 <sup>ns</sup>
<b>Manaus</b>	4	6	0.66	0.00153	-0.279 <sup>ns</sup>
<b>Oiapoque</b>	3	5	0.81	0.00202	0.025 <sup>ns</sup>
<b>Porto Velho</b>	1	2	0.37	0.00067	0.699 <sup>ns</sup>
<b>Plácido de Castro</b>	3	4	0.67	0.00161	0.163 <sup>ns</sup>
<b>Todas as amostras</b>	4	9	0.61	0.00141	0.077 <sup>ns</sup>

Ns: não significativo ( $p > 0,10$ ).

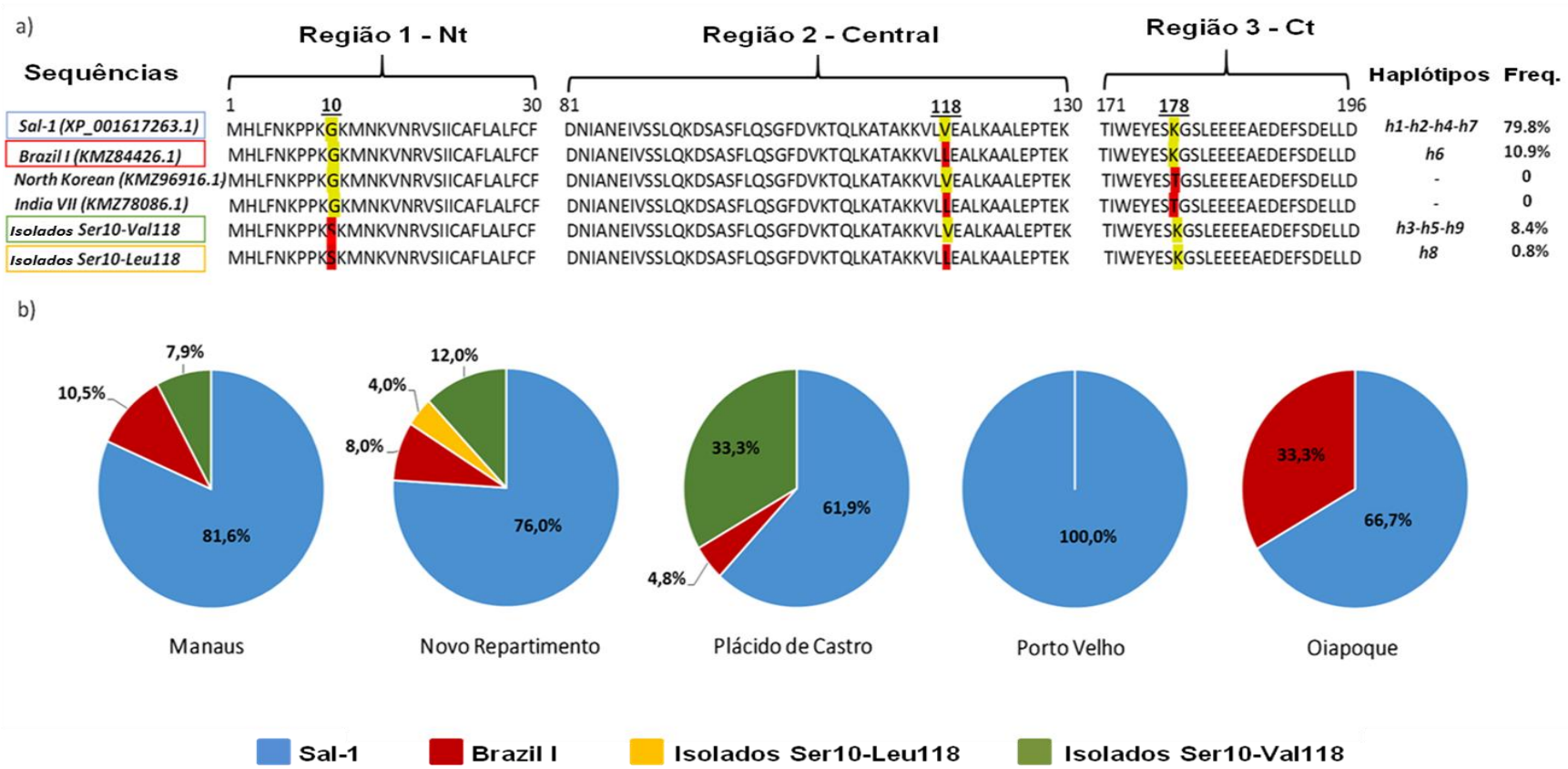
**Tabela 5** - Diferenciação genética entre os isolados da Amazônia Brasileira, mensurado por valores pareados ( $F_{ST}$ ).

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

Os valores de  $F_{ST}$  não foram significativos após a correção de Bonferroni ( $p > 0,05$ ).

#### **4.4 Substituições de aminoácidos e demais sequências gênicas de *P. vivax***

As mutações não sinônimas detectadas promoveram as substituições específicas de aminoácidos nas posições 10 (glicina por serina) e 118 (valina por leucina). Tal como observado nos alinhamentos da sequência de nucleotídeos, a PvCeRTOS também apresentou um alto grau de conservação da sequência de aminoácido, uma vez que apenas 24 amostras (20,1%) apresentaram mutações não sinônimas em comparação com a sequência referência Sal-1, cuja frequência foi significativamente maior (79,8%;  $p < 0,0001$ ). Subsequentemente, foi feito o alinhamento da sequência com mutações em relação as outras três proteínas hipotéticas de CeRTOS derivadas do genoma de *P. vivax* disponíveis no banco de dados PubMed, a saber: *Brazil I*, *North Korean* e *India VII* (Figura 11a). Apenas 13 isolados (10,9%) apresentaram sequências idênticas à cepa *Brazil I* e nenhum dos isolados apresentaram homologia completa com a cepa *North Korean* e *India VII*. No entanto, ambas as linhagens asiáticas também apresentaram mutações na região C terminal na posição 178 (lisina por treonina) que não foram detectadas em nossos isolados da Amazônia Brasileira. Curiosamente, a mutação na posição 10 (Gly10Ser) nunca foi detectada nas sequências disponíveis, mas está presente em 9,2% das nossas amostras. Em relação às cinco regiões estudadas, todos os isolados de Porto Velho apresentaram homologia completa com a sequência Sal-1 (Figura 11b).



**Figura 11** - Alinhamento das sequências das proteínas e frequência das mutações nos isolados.

(A) Alinhamento entre a cepa de referência (Sal-1), proteínas da CeTOS derivadas do genoma de *P. vivax* (Brazil I, North Korean e India VII) e isolados mutantes Ser10-Val118 e Ser10-Leu118. As marcações em amarelo representam o aminoácido idêntico ao observado na sequência referência Sal-1, enquanto as marcações em vermelho representam o aminoácido mutado. (B) Frequências de mutações nos isolados de diferentes regiões da Amazônia Brasileira. Nt: amino-terminal; Ct: carboxi-terminal; h1 ao h9: haplótipos.

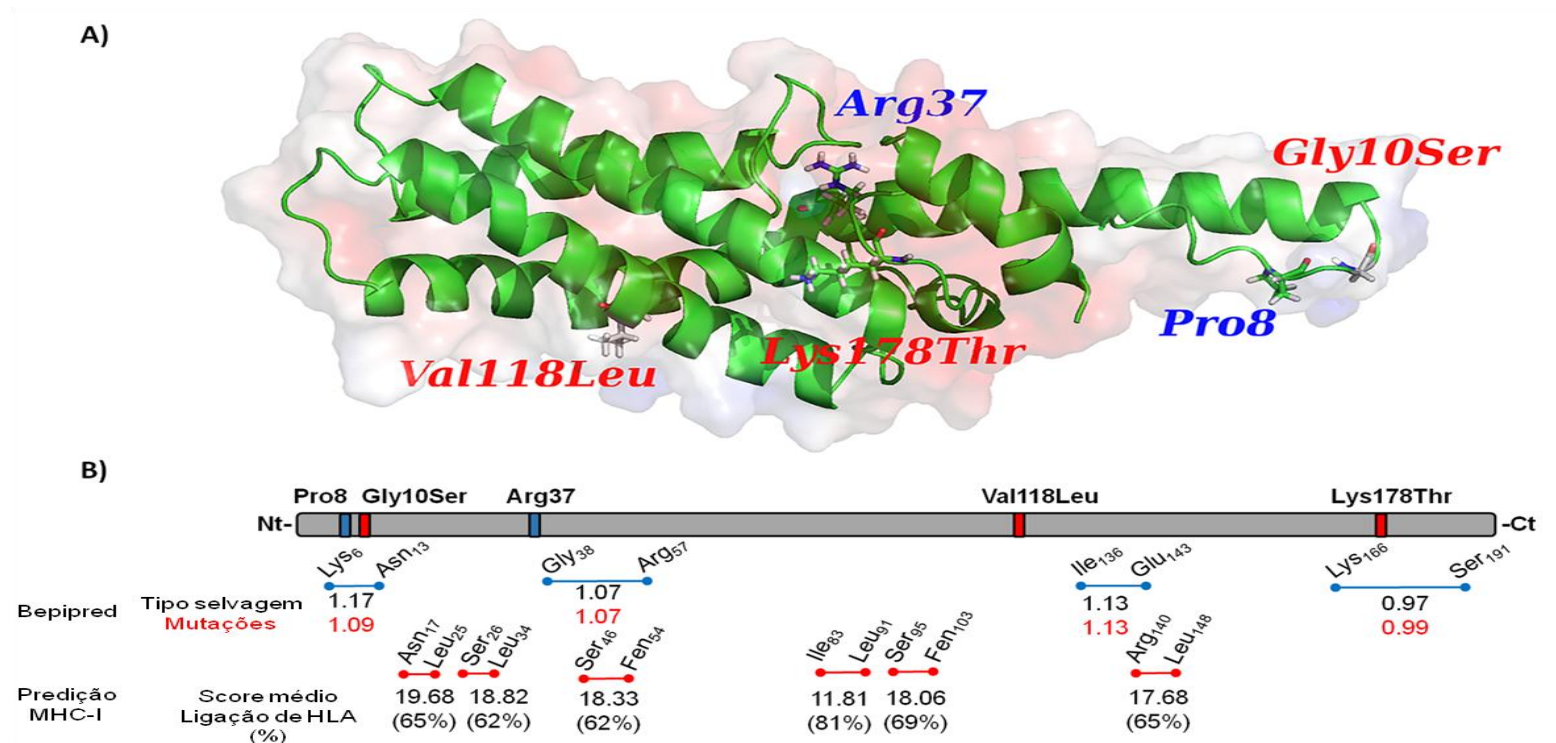
## 4.5 Modelagem molecular e predição de epítomos

Observando a diversidade identificada de acordo com o gene *pvceltos*, os nossos dados indicam que é limitada em isolados de diferentes regiões da Amazônia Brasileira. No entanto, as duas mutações não sinônimas encontradas podem ter um impacto sobre o dobramento de proteínas e também influenciar o seu potencial como um epítomo.

A Figura 12a ilustra o potencial eletrostático em torno das mutações. A região que engloba Arg37 mostra uma superfície carregada negativamente forte. A posição Lys178 mostrou o mesmo padrão negativo, enquanto Gly10 e Val118 são carregados positivamente. A região Pro8 é na maior parte neutra. As regiões Arg37 e Val118 são parte de uma estrutura de alfa hélice estável, ao passo que Pro8, Gly10, e Lys178 pertencem às estruturas de alça flexível. Além disso, todos os resíduos estão expostos à superfície, exceto Arg37 que está escondido no interior da parte carregada negativamente. Embora haja as substituições não sinônimas de aminoácido, observamos que não ocorre alteração da carga iônica, um fator importante, visto que o potencial eletrostático poderia influenciar na cinética de ligação da proteína. Como mostrado na Figura 12b quatro potenciais epítomos lineares com, pelo menos, oito aminoácidos foram identificados na sequência da proteína inteira (Lys6-Asn13; Gly38-Arg57; Ile136-Glu143 e Lys166-Ser191). As pontuações de predição variaram de 0,97 a 1,17 e nenhum epítomo imunodominante foi identificado por esta abordagem. Considerando-se que duas das mutações não sinônimas foram inseridas em epítomos lineares de células B preditos (Gly10Ser e Lys178Thr), analisamos os escores de predição dos epítomos que sofrem mutações. Curiosamente, a mutação Lys178Thr na região C-terminal, observada apenas em cepas asiáticas, *North Korean* (KMZ96916.1) e *Indian VII* (KMZ78086.1), resultou em um ligeiro aumento de escore de predição; enquanto que a mutação Gly10Ser na região N-terminal, observado em nossos isolados brasileiros Ser10-Val118 e Ser10-Leu118, resultaram na diminuição da pontuação predita para um epítomo (Figura 12b).

Por outro lado, os epítomos TCD8<sup>+</sup> preditos foram conservados entre todas as sequências e isolados já conhecidos, uma vez que não foram observadas mutações não sinônimas dentro destes epítomos. Analisando a sequência completa de

PvCeITOS, seis epítomos TCD8<sup>+</sup> preditos apresentaram pontuação consenso menor do que 20 e foi predito serem reconhecidos por mais de 60% do HLA analisado (Figura 12b). Entre estes epítomos, a sequência IVSEDAYFL (PvCeITOS<sub>Ile83-Leu91</sub>) foi considerada um potencial epítomo TCD8<sup>+</sup>, uma vez que foi predito como ligado por 81% dos HLAs avaliados e apresentou uma pontuação média consenso de 11,81.



**Figura 12** - Estrutura de modelagem e análise *in silico* de PvCelTOS.

(A) As mutações sinônimas e não sinônimas foram ilustradas pela fonte em azul e em vermelho, respectivamente, na estrutura 3D de PvCelTOS. As nuvens vermelhas e azuis representam a superfície negativa e positiva, respectivamente. (B) Mutações sinônimas e não sinônimas encontradas em nossa população e outras mutações descritas foram ilustradas por barras azuis e barras vermelhas, respectivamente, na estrutura de PvCelTOS. 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 o escore médio de predição de ligação de epítomos de TCD8<sup>+</sup> e a respectiva frequência de ligação de HLA entre 27 HLA avaliados. Não foram observadas diferenças entre os epítomos de células T de predição entre os tipos selvagens ou mutados da PvCelTOS.



## 5 DISCUSSÃO

A proteína CelTOS (Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites) tem sido considerada uma nova alternativa potencial para uma vacina contra a malária. Embora a sua função biológica não esteja completamente elucidada, o seu papel central na travessia celular no epitélio intestinal do inseto vetor e nos hepatócitos do hospedeiro vertebrado é importante para o sucesso da infecção. Estudos imunológicos têm demonstrado que a CelTOS é um alvo de resposta imune celular naturalmente adquirida em indivíduos expostos (64), bem como da resposta humoral em modelo experimental (66). No entanto, um dos principais obstáculos no desenvolvimento de vacinas contra a malária ainda é a baixa eficiência na indução de proteção, que em parte, pode ser explicada por polimorfismos genéticos que codificam mutações não sinônimas em proteínas utilizadas como imunógenos (87). Neste contexto, o sequenciamento do genoma de vários organismos e os avanços em bioinformática revolucionou o campo da vacinologia, permitindo a identificação de candidatos vacinais que apresentam baixa variação antigênica. Atualmente, vários estudos a respeito da diversidade genética de *Plasmodium* sp. têm sido descritos em *P. vivax* e em genes codificantes de diversos determinantes antigênicos [Revisado por (88)], tais como CSP (Proteína Circunsporozoíta) (89), MSP (Proteínas de Superfície de Merozoíto) (90), DBP (Proteína de Ligação ao Duffy) (91) e AMA-1 (Antígeno de Membrana Apical-1) (92). Na verdade, a diversidade genética destas proteínas nas áreas hiperendêmicas tem sido descrita como um fator limitante para a rápida aquisição de imunidade protetora e, como consequência, tem implicações para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Além disso, o polimorfismo antigênico de candidatos a vacinas de *P. vivax* tem sido pouco discutido nas áreas de transmissão instável, como as áreas endêmicas brasileiras. Dessa forma, considerando que a epidemiologia da malária no Brasil apresenta uma transmissão instável e o conhecimento sobre o polimorfismo genético da PvCelTOS permanecem desconhecidos, esse estudo teve como objetivo identificar o gene *pvceltos* em isolados de diferentes regiões da Amazônia Brasileira e estudar os possíveis impactos da diversidade genética da PvCelTOS em estruturas de proteínas e epítomos preditos.

A identificação e a avaliação da diversidade genética do gene *pvceltos* em isolados de diferentes regiões geográficas não tinha sido previamente estudada e este foi o primeiro trabalho. Apesar da grande distância entre as localidades estudadas, a possível existência de um fluxo de genes do genoma de *P. vivax* entre as populações, associada à migração de pessoas, poderia propiciar a diversidade genética do parasita (93). Entretanto, nossos primeiros resultados mostraram que o gene *pvceltos* é altamente conservado, apresentando apenas 4 SNPs ao longo de toda a sua sequência, 2 mutações sinônimas e 2 mutações não sinônimas. Este grau elevado de conservação era esperado, uma vez que foi mostrado que a sequência de aminoácidos da CelTOS é parcialmente conservada mesmo entre três diferentes espécies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. berghei* e *P. falciparum*), o que indica que o gene *celtos* evoluiu de um ancestral comum do gênero *Plasmodium* (61). Em relação ao gene *celtos* específico de *P. vivax*, há uma escassez de informação disponível. Na verdade, foram descritas apenas quatro sequências diferentes oriundas de genomas completos: *Sal-1*, *Brazil I*, *North Korean* e *India VII*. Portanto, mesmo com o elevado grau de conservação da sequência do gene *pvceltos* em relação à sequência referência *Sal-1*, todas as demais sequências também apresentaram pelo menos um SNP. Nos nossos isolados estudados, a mutação sinônima C109A era predominante e significativamente mais frequente do que todas as outras 3 mutações encontradas, enquanto a outra mutação sinônima C24A foi a menos frequente. É importante mencionar que esta mutação predominante (C109A) está também presente na cepa *P01* humana, um novo genoma de referência para *P. vivax* de um isolado clínico da Indonésia (94). Classicamente, as alterações sinônimas não possuíam nenhum efeito sobre a proteína e foram chamadas de mutação silenciosa. No entanto, estudos mostram que as alterações de nucleotídeos mesmo sendo sinônimas também podem afetar a expressão de genes em proteínas (95-97) [Revisado por (98)]. Na maioria dos genes codificantes de proteínas, a taxa de substituições sinônimas é maior que a taxa de substituições não sinônimas, e isso tem sido mostrado em outras proteínas de *Plasmodium*, tais como PfAMA-1 (99). Interessantemente, em relação à PvCelTOS, nós podemos observar um perfeito balanço entre o número de mutações sinônimas e não sinônimas dentre o limitado polimorfismo encontrado nos isolados de diferentes regiões geográficas brasileiras.

Este equilíbrio e a baixa diversidade observada levam a, pelo menos, duas hipóteses: em primeiro lugar, que há uma baixa pressão seletiva do sistema

imunológico contra este antígeno, o que pode ser corroborada por recentes descobertas de Longley e colaboradores, que demonstraram uma baixa frequência de anticorpos naturalmente adquiridos contra PvCelTOS em comparação com outros antígenos de esporozoítos, como a CSP (100) e, em segundo lugar, que a grande importância desta proteína no processo de travessia de esporozoítos e oocinetos pode refletir no perfil de alta conservação observada nas sequências do nosso estudo. Portanto, com o objetivo de avaliar o grau de diversidade da PvCelTOS em diferentes isolados da Amazônia Brasileira, nós também comparamos a sequência de aminoácidos de cada isolado com a sequência referência (Sal-1) e com de outras três proteínas CelTOS provenientes de genomas hipotéticos de *P. vivax* (*Brazil I*, *North Korean* e *India VII*). Curiosamente, os isolados apresentaram maior semelhança em relação à sequência de referência do que para a sequência *Brazil I*, que apresentaram sequências idênticas em apenas 13 isolados. Além disso, nenhum dos nossos isolados apresentou homologia completa com as cepas *North Korean* e *India VII*; ambas as cepas asiáticas apresentaram uma mutação na região C-terminal, posição 178, que não foi detectada nos nossos isolados da Amazônia. Além disso, observou-se uma mutação na região N-terminal, posição 10 (Gly10Ser), que nunca tinha sido detectada nas sequências disponíveis do PubMed, mas que está presente em 9,2% das nossas amostras, como isolados Ser10-Leu118 e Ser10-Val118. Essa mutação estava presente em três localidades distantes (Manaus, Novo Repartimento e Plácido de Castro) e foi mais frequente que a sequência da cepa *Brazil I* no Novo Repartimento e Plácido de Castro. Interessantemente, embora a distância de Novo Repartimento, Plácido de Castro e Manaus para Oiapoque poderiam dificultar o fluxo gênico e sugerir uma explicação para a ausência desta mutação na população Oiapoque, a baixa frequência de fluxo gênico promovido pela distância não deve ser a razão para a ausência desta mutação nas populações, visto que Porto Velho, que está mais perto de Plácido Castro (a localidade com maior frequência desta mutação), também não apresentavam esta mutação.

Devido ao alto grau de similaridade não foi possível determinar a estrutura genética com base nas localidades, e as sequências e os haplótipos não poderiam ser elegíveis para a construção de uma árvore filogenética. No entanto, foi possível identificar 9 haplótipos diferentes da *pvceltos* entre os 119 isolados de *P. vivax* das regiões amazônicas que foram analisadas. Em relação às sequências da *pvceltos*, observou-se que o haplótipo H1 e H4 estavam presentes em todas as localidades

estudadas, no entanto, o haplótipo H4 apresentou a maior frequência e foi significativamente maior quando comparado com a referência H1. Esses achados sugerem uma distribuição global de parasitas contendo genótipos de *Pvceltos* semelhantes. Além disso, a existência de mesmos haplótipos em diferentes áreas endêmicas de malária será importante para a lógica de modelos de vacina contra a malária.

Assim como outros antígenos de fase pré-eritrocítica, a imunidade focada na CelTOS depende das respostas imunes humoral e celular (65). Apesar da reatividade cruzada entre espécies, já visto em trabalho anterior (64), no qual a CelTOS de *P. falciparum* induz proteção de espécies cruzadas no desafio heterólogo com *P. berghei*, há um baixo grau de similaridade entre a CelTOS de *P. falciparum* e *P. vivax* (63%). Além disso, estudos baseados em diversidade genética em proteínas de superfície de merozoíto de *P. falciparum*, demonstraram que as mutações não sinônimas contribuem para a variabilidade do parasita e proporcionam uma evasão da imunidade do hospedeiro (101).

Assim, para avaliar os alvos de resposta imune na PvCelTOS e avaliar os efeitos potenciais de mutações não sinônimas sobre a resposta imune contra PvCelTOS, nós utilizamos abordagens *in silico* para determinar diferenças em epítomos de células B e células TCD8<sup>+</sup> entre a cepa de referência (Salvador-1) e os isolados mutantes da PvCelTOS. Primeiramente, quatro epítomos foram preditos como epítomos lineares de células B na sequência completa de PvCelTOS. Curiosamente, as mutações não sinônimas não modificaram substancialmente o potencial destes epítomos preditos, afetando pouco a sua pontuação de predição. De fato, foi demonstrado que as poucas alterações de aminoácidos podem afetar a ligação de peptídeos à moléculas de MHC, reduzir o reconhecimento pelas células T ou gerar peptídeos antagonistas que inibem a ativação de células T específicas via complexo peptídeo-MHC [Revisado por (102)]. Por conseguinte, em relação aos potenciais epítomos de células T, seis epítomos TCD8<sup>+</sup> foram preditos como hipotéticos epítomos promíscuos, apresentando uma frequência de ligação de HLA superior a 60% e uma classificação consenso média inferior a 20. Curiosamente, PvCelTOS tinha epítomos TCD8<sup>+</sup> conservados entre todas as diferentes cepas e isolados, uma vez que não existem mutações não sinônimas inseridas em quaisquer epítomos de células T preditos. Isto suporta a necessidade de identificar e validar epítomos de células T de PvCelTOS que possam ser interessantes em novas abordagens de vacinas.

O *P. vivax* apresenta quase o dobro de diversidade genética em comparação ao *P. falciparum* em termos de diversidade de SNPs. Isto implica que a população mundial de *P. vivax* pode ter uma capacidade para uma maior variação funcional, principalmente em famílias de genes associados com a evasão imune e a invasão dos eritrócitos. No nosso estudo a baixa variação na sequência do gene PvCeITOS pode sugerir que este perfil conservado é importante para a sobrevivência e a transmissão do parasita. Além disso, apesar de alguns estudos mostrarem a influência da seleção natural positiva sobre a variabilidade genética de outras vacinas candidatas de *P. vivax*, como a PvAMA-1, PvDBP e PvTRAP (103-105), nossos resultados de predição de epítipo indicam que o pouco polimorfismo na CeITOS de *P. vivax* não é mantida através de uma seleção balanceada relacionada com a prevenção do reconhecimento imunológico pelo hospedeiro humano. No entanto, investigações futuras visando a resposta imune celular naturalmente adquirida e humoral contra antígenos derivados da PvCeITOS são ainda necessários para corroborar o potencial dessa proteína como um candidato vacinal.

## 6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados deste trabalho verifica-se que:

- O gene que codifica a proteína PvCelTOS foi encontrado em 100% das amostras estudadas na Amazônia Brasileira;
- A sequência da PvCelTOS apresenta pouca diversidade em relação a outros candidatos vacinais de *P. vivax*, apresentando um perfil conservado;
- Há uma predominância da mutação sinônima C109A entre as 5 regiões brasileiras estudadas;
- Isolados de *P. vivax* circulantes em Manaus apresentaram a maior diversidade (4 SNPs detectados) enquanto os de Porto Velho apresentaram a menor (apenas um SNP);
- Há um perfeito balanço entre as mutações sinônimas e não sinônimas dentre os poucos polimorfismos encontrados em diferentes regiões geográficas;
- A mutação na posição 10 (Gly10Ser) nunca foi detectada nas sequências descritas previamente, mas está presente em 9,2% dos nossos isolados;
- As mutações não sinônimas detectadas parecem não alterar substancialmente o potencial antigênico da PvCelTOS;
- A PvCelTOS possui potenciais epítomos TCD8<sup>+</sup> conservados entre todas as diferentes cepas e isolados, visto a ausência de mutações não sinônimas inseridas nesses epítomos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(4):564-94.
2. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & vectors*. 2010;3(1):5.
3. Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a Journey in Time: In Search of the Lost Myths and Forgotten Stories. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2010;340(6).
4. Mangano VD, Modiano D. An evolutionary perspective of how infection drives human genome diversity: the case of malaria. *Curr Opin Immunol*. 2014;30:39-47.
5. W.H.O. World Malaria Report. 2016.
6. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria journal*. 2010;9:115.
7. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasites & vectors*. 2010;3:72.
8. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of Plasmodium vivax transmission in 2009. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(8):e774.
9. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in Plasmodium vivax relapse. *Malaria journal*. 2014;13:144.
10. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious diseases*. 2009;9(9):555-66.
11. Sanitária S-SdV. DATASUS - SIVEP -MALARIA [http://200.214.130.44/sivep\\_malaria/2015](http://200.214.130.44/sivep_malaria/2015) [cited 2016 01/04/2016]. Epidemiological report of malaria cases in Brazil on period of 01//2015 to 31/12/. Available from: [http://200.214.130.44/sivep\\_malaria/relatorio/rel\\_resumo\\_nacional\\_mensal.asp?tx\\_opcao\\_agravo=MALARIA&opcao\\_agravo=B54%20&dt\\_inicial=01/01/2015&dt\\_final=31/12/2015&niv\\_relatorio=NACIONAL](http://200.214.130.44/sivep_malaria/relatorio/rel_resumo_nacional_mensal.asp?tx_opcao_agravo=MALARIA&opcao_agravo=B54%20&dt_inicial=01/01/2015&dt_final=31/12/2015&niv_relatorio=NACIONAL).
12. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(6):701-18.
13. de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suarez-Mutis MC, Santelli AC, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):618-33.

14. Ministério da Saúde. Mapa de risco Brasil2014 [cited 2016 09 de fevereiro de 2016.]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>.
15. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*. 2006;12(2):220-4.
16. Vanderberg JP. Imaging mosquito transmission of Plasmodium sporozoites into the mammalian host: immunological implications. *Parasitology international*. 2014;63(1):150-64.
17. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(43):18640-5.
18. Voza T, Miller JL, Kappe SH, Sinnis P. Extrahepatic exoerythrocytic forms of rodent malaria parasites at the site of inoculation: clearance after immunization, susceptibility to primaquine, and contribution to blood-stage infection. *Infection and immunity*. 2012;80(6):2158-64.
19. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends in parasitology*. 2015;31(8):357-62.
20. Garcia-Basteiro AL, Bassat Q, Alonso PL. Approaching the target: the path towards an effective malaria vaccine. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2012;4(1):e2012015.
21. Vaughan AM, Aly AS, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. *Cell host & microbe*. 2008;4(3):209-18.
22. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001;291(5501):141-4.
23. Mota MM, Hafalla JC, Rodriguez A. Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. *Nature medicine*. 2002;8(11):1318-22.
24. Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitology research*. 2011;108(1):247-52.
25. Lindner SE, Miller JL, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cellular microbiology*. 2012;14(3):316-24.
26. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313(5791):1287-90.
27. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006;124(4):755-66.



28. Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. *Current opinion in genetics & development*. 2006;16(4):384-91.
29. Alano P. Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Molecular microbiology*. 2007;66(2):291-302.
30. Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cellular microbiology*. 2004;6(7):671-85.
31. Guttery DS, Roques M, Holder AA, Tewari R. Commit and Transmit: Molecular Players in Plasmodium Sexual Development and Zygote Differentiation. *Trends in parasitology*. 2015;31(12):676-85.
32. Baton LA, Ranford-Cartwright LC. How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall? *Trends in parasitology*. 2005;21(1):22-8.
33. Angrisano F, Tan YH, Sturm A, McFadden GI, Baum J. Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut--placing the Plasmodium ookinete centre stage. *International journal for parasitology*. 2012;42(6):519-27.
34. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: a brief review. *The Korean journal of parasitology*. 2009;47(2):93-102.
35. Ngasala B, Mubi M, Warsame M, Petzold MG, Massele AY, Gustafsson LL, et al. Impact of training in clinical and microscopy diagnosis of childhood malaria on antimalarial drug prescription and health outcome at primary health care level in Tanzania: a randomized controlled trial. *Malaria journal*. 2008;7:199.
36. Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JF. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;66(5):503-8.
37. Vo TK, Bigot P, Gazin P, Sinou V, De Pina JJ, Huynh DC, et al. Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(5):422-8.
38. Laoboonchai A, Kawamoto F, Thanosingha N, Kojima S, Scott Miller RR, Kain KC, et al. PCR-based ELISA technique for malaria diagnosis of specimens from Thailand. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2001;6(6):458-62.
39. Schindler HC, Montenegro L, Montenegro R, Carvalho AB, Abath FG, Jaureguiberry G. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(4):355-61.
40. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(3):1087-9.

41. Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KC, Oliveira AM, Ferreira SR, Boulos M. PCR -- based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2004;46(4):183-7.
42. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;77(6 Suppl):79-87.
43. Picot S. [Is Plasmodium vivax still a paradigm for uncomplicated malaria?]. *Medecine et maladies infectieuses*. 2006;36(8):406-13.
44. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarencio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria journal*. 2010;9:13.
45. Singh H, Parakh A, Basu S, Rath B. Plasmodium vivax malaria: is it actually benign? *Journal of infection and public health*. 2011;4(2):91-5.
46. WHO. Tables of malaria vaccine projects globally 2014.
47. Moreno A, Joyner C. Malaria vaccine clinical trials: what's on the horizon. *Current opinion in immunology*. 2015;35:98-106.
48. Mueller I, Taime J, Ibam E, Kundi J, Lagog M, Bockarie M, et al. Complex patterns of malaria epidemiology in the highlands region of Papua New Guinea. *Papua and New Guinea medical journal*. 2002;45(3-4):200-5.
49. Udhayakumar V, Saekhou A, Fang S, Jue D, Wohlhueter RM, Lal AA. Immunogenicity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax circumsporozoite protein repeat multiple antigen constructs (MAC). *Vaccine*. 1998;16(9-10):982-8.
50. Zeyrek FY, Babaoglu A, Demirel S, Erdogan DD, Ak M, Korkmaz M, et al. Analysis of naturally acquired antibody responses to the 19-kd C-terminal region of merozoite surface protein-1 of Plasmodium vivax from individuals in Sanliurfa, Turkey. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;78(5):729-32.
51. Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MC, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of Plasmodium vivax. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(3):335-9.
52. Arevalo-Herrera M, Castellanos A, Yazdani SS, Shakri AR, Chitnis CE, Dominik R, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant vaccine based on the receptor-binding domain of the Plasmodium vivax Duffy binding protein in Aotus monkeys. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;73(5 Suppl):25-31.
53. Lalitha PV, Biswas S, Pillai CR, Saxena RK. Immunogenicity of a recombinant malaria vaccine candidate, domain I+II of AMA-1 ectodomain, from Indian P. falciparum alleles. *Vaccine*. 2008;26(35):4526-35.
54. Arevalo-Herrera M, Herrera S. Plasmodium vivax malaria vaccine development. *Molecular immunology*. 2001;38(6):443-55.

55. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Fernandez OL, Victoria L, Lenis AM, et al. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a Plasmodium vivax circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;73(5 Suppl):3-9.
56. Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. *International journal for parasitology*. 2005;35(2):185-92.
57. Beeson JG, Crabb BS. Towards a vaccine against Plasmodium vivax malaria. *PLoS medicine*. 2007;4(12):e350.
58. Penny MA, Maire N, Studer A, Schapira A, Smith TA. What should vaccine developers ask? Simulation of the effectiveness of malaria vaccines. *PloS one*. 2008;3(9):e3193.
59. King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(24):8363-8.
60. Duffy PE, Sahu T, Akue A, Milman N, Anderson C. Pre-erythrocytic malaria vaccines: identifying the targets. *Expert review of vaccines*. 2012;11(10):1261-80.
61. Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Molecular microbiology*. 2006;59(5):1369-79.
62. Jimah JR, Salinas ND, Sala-Rabanal M, Jones NG, Sibley LD, Nichols CG, et al. Malaria parasite CelTOS targets the inner leaflet of cell membranes for pore-dependent disruption. *eLife*. 2016;5.
63. Bergmann-Leitner ES, Chaudhury S, Steers NJ, Sabato M, Delvecchio V, Wallqvist AS, et al. Computational and experimental validation of B and T-cell epitopes of the in vivo immune response to a novel malarial antigen. *PloS one*. 2013;8(8):e71610.
64. Bergmann-Leitner ES, Mease RM, De La Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, Ockenhouse C, et al. Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from Plasmodium falciparum elicits cross-species protection against heterologous challenge with Plasmodium berghei. *PloS one*. 2010;5(8):e12294.
65. Bergmann-Leitner ES, Legler PM, Savranskaya T, Ockenhouse CF, Angov E. Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CelTOS. *Vaccine*. 2011;29(35):5940-9.
66. Anum D, Kusi KA, Ganeshan H, Hollingdale MR, Ofori MF, Koram KA, et al. Measuring naturally acquired ex vivo IFN-gamma responses to Plasmodium falciparum cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) in Ghanaian adults. *Malaria journal*. 2015;14:20.

67. Kusi KA, Bosomprah S, Dodoo D, Kyei-Baafour E, Dickson EK, Mensah D, et al. Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. *Malaria journal*. 2014;13:103.
68. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Diaz E, Dunachie S, Kumpitak C, Nguitragool W, et al. Acquisition and Longevity of Antibodies to Plasmodium vivax Preerythrocytic Antigens in Western Thailand. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2015;23(2):117-24.
69. Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Lopez-Camacho C, Martins da Silva JH, Perce-da-Silva DS, Teva A, et al. Plasmodium vivax Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites: Naturally Acquired Humoral Immune Response and B-Cell Epitope Mapping in Brazilian Amazon Inhabitants. *Frontiers in immunology*. 2017;8:77.
70. Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gemmill AW, Anders RF, et al. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in Plasmodium falciparum. *Molecular microbiology*. 2004;52(1):159-68.
71. Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods in molecular biology*. 1996;50:263-91.
72. Pratt-Riccio LR, Sallenave-Sales S, de Oliveira-Ferreira J, da Silva BT, Guimaraes ML, Santos F, et al. Evaluation of the genetic polymorphism of Plasmodium falciparum P126 protein (SERA or SERP) and its influence on naturally acquired specific antibody responses in malaria-infected individuals living in the Brazilian Amazon. *Malaria journal*. 2008;7:144.
73. Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003;19(18):2496-7.
74. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3):585-95.
75. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 2010;10(3):564-7.
76. 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 9:89-99.
77. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990;215(3):403-10.
78. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*. 1997;25(17):3389-402.

79. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D222-30.
80. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(18):10037-41.
81. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*. 2006;2:2.
82. Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, Tamang D, Wang P, Greenbaum J, et al. Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Web Server issue):W525-30.
83. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2003;12(5):1007-17.
84. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic acids research*. 2008;36(Web Server issue):W509-12.
85. Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC bioinformatics*. 2005;6:132.
86. Sidney J, Assarsson E, Moore C, Ngo S, Pinilla C, Sette A, et al. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome research*. 2008;4:2.
87. Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Molecular and biochemical parasitology*. 1993;59(1):1-14.
88. de Souza-Neiras WC, de Melo LM, Machado RL. The genetic diversity of *Plasmodium vivax*--a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(3):245-54.
89. Mann VH, Huang T, Cheng Q, Saul A. Sequence variation in the circumsporozoite protein gene of *Plasmodium vivax* appears to be regionally biased. *Molecular and biochemical parasitology*. 1994;68(1):45-52.
90. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Molecular and biochemical parasitology*. 1997;84(1):49-56.
91. Sousa TN, Ceravolo IP, Fernandes Fontes CJ, Couto A, Carvalho LH, Brito CF. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain

among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Molecular and biochemical parasitology*. 2006;146(2):251-4.

92. Figtree M, Pasay CJ, Slade R, Cheng Q, Cloonan N, Walker J, et al. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. *Molecular and biochemical parasitology*. 2000;108(1):53-66.

93. Zakeri S, Safi N, Afsharpad M, Butt W, Ghasemi F, Mehrizi AA, et al. Genetic structure of *Plasmodium vivax* isolates from two malaria endemic areas in Afghanistan. *Acta tropica*. 2010;113(1):12-9.

94. Auburn S, Bohme U, Steinbiss S, Trimarsanto H, Hostetler J, Sanders M, et al. A new *Plasmodium vivax* reference sequence with improved assembly of the subtelomeres reveals an abundance of pir genes. *Wellcome open research*. 2016;1:4.

95. Chamary JV, Parmley JL, Hurst LD. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(2):98-108.

96. Plotkin JB, Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(1):32-42.

97. Schattner P, Diekhans M. Regions of extreme synonymous codon selection in mammalian genes. *Nucleic acids research*. 2006;34(6):1700-10.

98. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(10):683-91.

99. Verra F, Hughes AL. Evidence for ancient balanced polymorphism at the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2000;105(1):149-53.

100. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Diaz E, Dunachie S, Kumpitak C, Nguitragool W, et al. Acquisition and Longevity of Antibodies to *Plasmodium vivax* Preerythrocytic Antigens in Western Thailand. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2016;23(2):117-24.

101. Kiwanuka GN. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997-2007. *Journal of vector borne diseases*. 2009;46(1):1-12.

102. Kang JM, Lee J, Cho PY, Moon SU, Ju HL, Ahn SK, et al. Population genetic structure and natural selection of apical membrane antigen-1 in *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malaria journal*. 2015;14:455.

103. Kang JM, Lee J, Cho PY, Moon SU, Ju HL, Ahn SK, et al. Population genetic structure and natural selection of apical membrane antigen-1 in *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malaria journal*. 2015;14(1):455.

104. Valizadeh V, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND. Population genetics and natural selection in the gene encoding the Duffy binding protein II in Iranian *Plasmodium*

vivax wild isolates. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;21:424-35.

105. Kosuwin R, Putaporntip C, Tachibana H, Jongwutiwes S. Spatial variation in genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein locus of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). *PloS one*. 2014;9(10):e110463.

## **8 ANEXOS**

### **8.1 Artigo I**



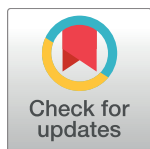
RESEARCH ARTICLE

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

Lana Bitencourt Chaves<sup>1</sup>, Daiana de Souza Perce-da-Silva<sup>2</sup>, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva<sup>1</sup>, João Hermínio Martins da Silva<sup>3</sup>, Gustavo Capatti Cassiano<sup>4</sup>, Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>5</sup>, Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>6</sup>, Dalma Maria Banic<sup>2</sup>, Josué da Costa Lima-Junior<sup>1\*</sup>

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

\* [josue@ioc.fiocruz.br](mailto:josue@ioc.fiocruz.br)



**OPEN ACCESS**

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

**Editor:** Nicholas P. Day, Mahidol University, THAILAND

**Received:** August 23, 2016

**Accepted:** January 21, 2017

**Published:** February 3, 2017

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

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

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

## Abstract

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

of a FAPERJ APQ1 (E-26/210.653/2015), Jovem Cientista do Nosso Estado (E26/203.255/2016). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

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

### Author summary

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

### Introduction

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

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

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

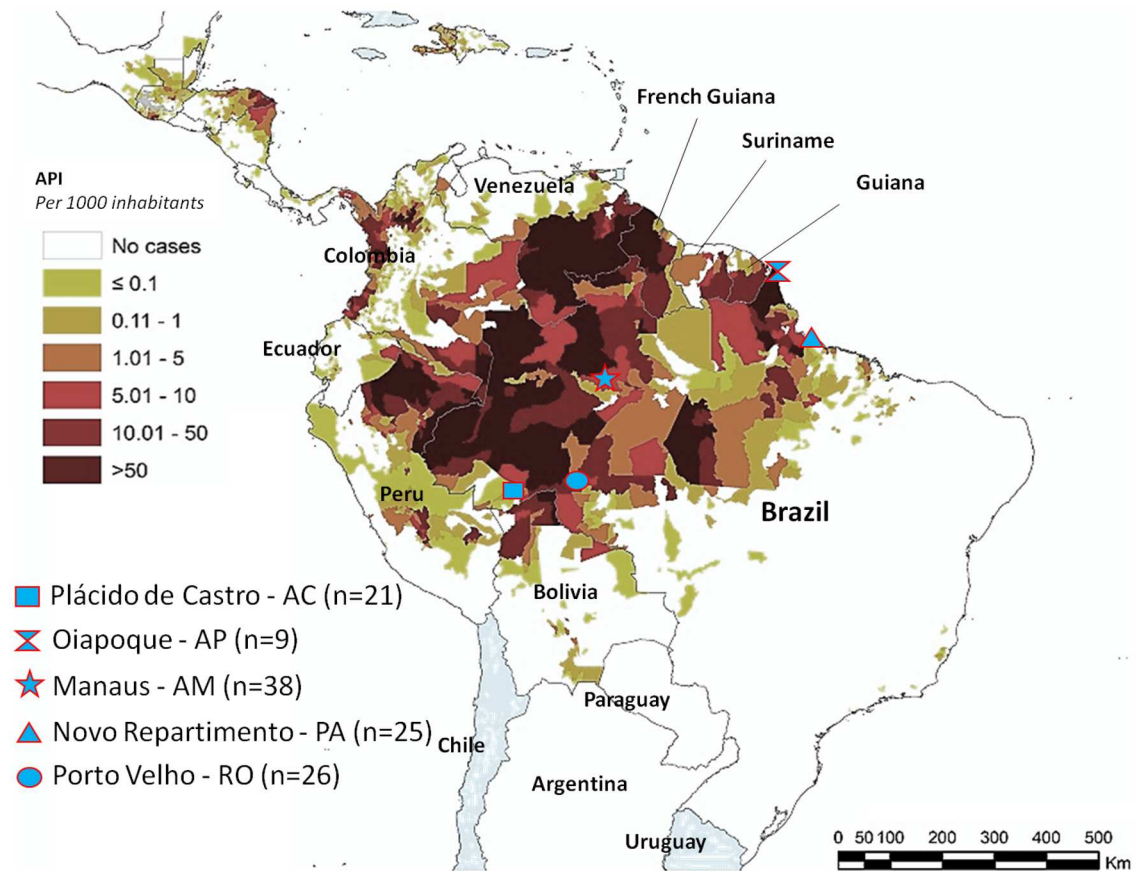
Although essential to the development of its potential as a vaccine candidate, there is no available published data on the identification of *pvceltos* gene in field isolates and the evaluation of its genetic diversity in endemic areas. In fact, the extensive genetic diversity in natural parasite populations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

## Methods

### Study sites and blood sample collection

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

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



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

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g001

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

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

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

Porto Velho (PVL), capital of the Rondônia State, located in Western Brazilian Amazon, with a population of 360,068 thousand inhabitants (16% aged above 18 years), at 85 meters above sea level, with a territorial area of 34,082 km<sup>2</sup>, latitude of -08° 45' 43" and longitude of 63° 45' 43", where the main economic activities are cattle breeding, rubber agriculture, wood exploration and farming. Active malaria transmission takes place during all periods of the year. The distances between the study sites are shown in [Table 1](#).

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

Locality	Distance (km)			
	OIP	MAO	NR	PVL
OIP	-	-	-	-
MAO	1,196	-	-	-
NR	938	1,143	-	-
PVL	1,939	760	1,635	-
PLC	2,313	1,119	2,024	393

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

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t001

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

### Ethical considerations

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

### Genomic DNA extraction

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

### Design of PvCelTOS specific primers

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



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

### PCR amplification of *pvceltos* gene

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

### DNA sequencing and polymorphism analysis

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

### 3D model and electrostatic analysis of PvCelTOS

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

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

## Prediction of linear B-cell and T-cell epitopes

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

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

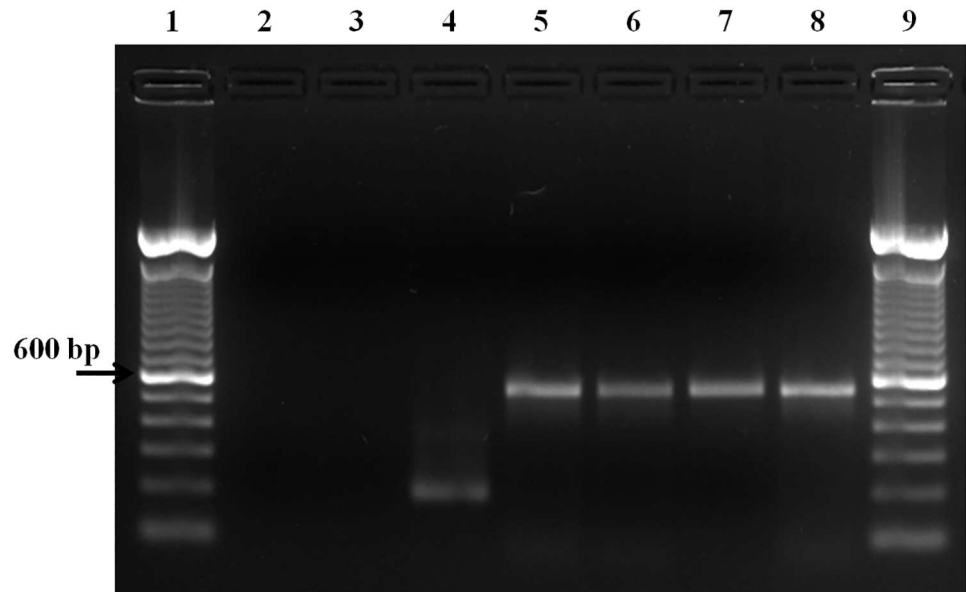
## Statistical analysis

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

## Results

### Standardization and molecular characterization of PvCelTOS in the studied regions

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



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

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g002

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

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

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



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

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

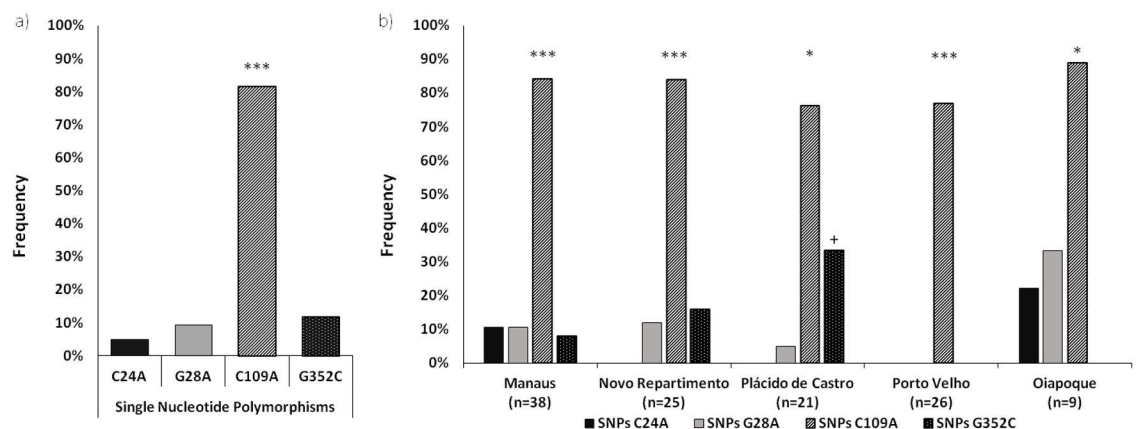
Nucleotide and amino acid positions

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t002

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

### PvCelTOS haplotype frequency in field isolates

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



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

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g003

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

Locality	Haplotypes PvCelTOS—n (%) (Nucleotide positions 24, 28, 109 and 352—CGCG)								
	Ref. strain—H1 (CGCG)	H2 (AGCG)	H3 (CACG)	H4 (CGAG)	H5 (CAAG)	H6 (CGAC)	H7 (AGAG)	H8 (CAAC)	H9 (AAAG)
Manaus (n = 38)	<b>5 (13.1%)</b>	1 (2.6%)	-	22 (57.8%) ***	4 (10.5%)	3 (7.9%)	3 (7.9%)	-	-
Novo Repartimento (n = 25)	<b>3 (12%)</b>	-	1 (4%)	16 (64%) ***	1 (4%)	3 (12%)	-	1 (4%)	-
Plácido de Castro (n = 21)	<b>3 (14.3%)</b>	-	1 (4.8%)*	10 (47.6%)*	-	7 (33.3%)	-	-	-
Porto Velho (n = 26)	<b>6 (23.1%)</b>	-	-	20 (76.9%) ***	-	-	-	-	-
Oiapoque (n = 9)	<b>1 (11.1%)</b>	-	-	4 (44.4%)*	2 (22.2%)	-	1 (11.1%)	-	1 (11.1%)
<b>Total (n = 119)</b>	<b>18 (15.1%)</b>	1 (0.8%)*	2 (1.7%)*	72 (60.5%) ***	7 (5.9%)*	13 (10.9%)	4 (3.4%)*	1 (0.8%)*	1 (0.8%)*

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

(\*): p<0.05;

(\*\*): p<0.01;

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

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t003

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

### Population genetic analysis

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

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

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

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

The extent of *pvceltos* gene sequence corresponds to nucleotides 19–569 (reference clone Sal-1).

<sup>ns</sup>: not significant ( $p > 0.10$ ).

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t004

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

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

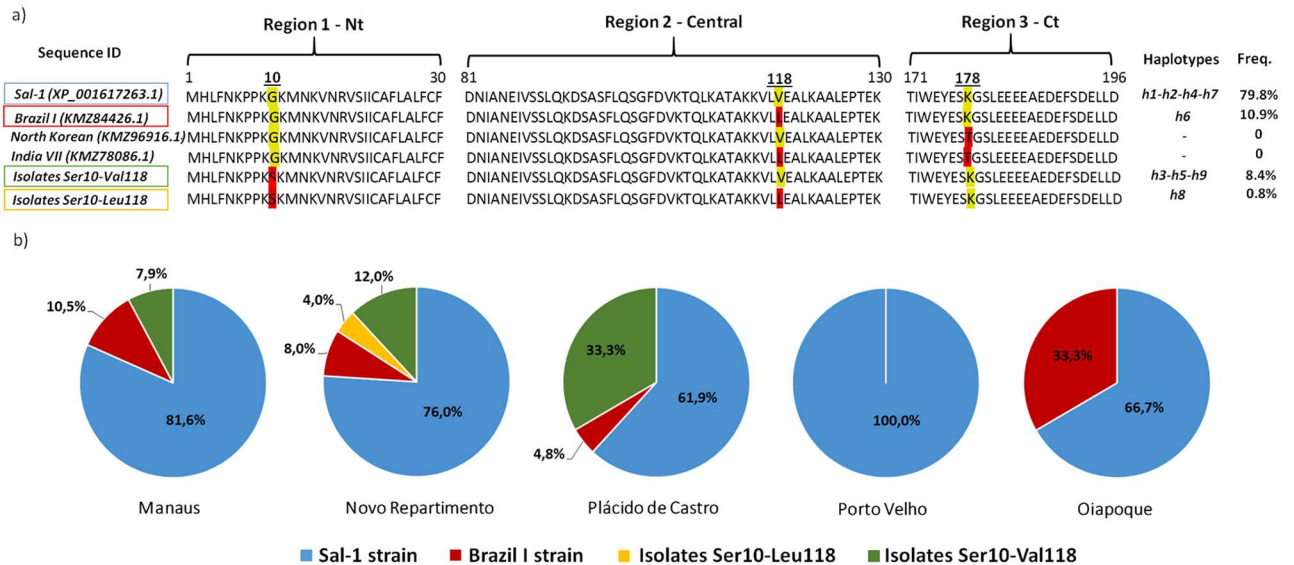
The detected non-synonymous mutations characterized the specific amino acid substitutions in positions 10 (Glycine for Serine) and 118 (Valine for Leucine). As observed in the protein sequence alignments, PvCelTOS also presented high amino acid sequence conservation degree, since only 24 isolates (19.2%)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

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

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

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

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.t005

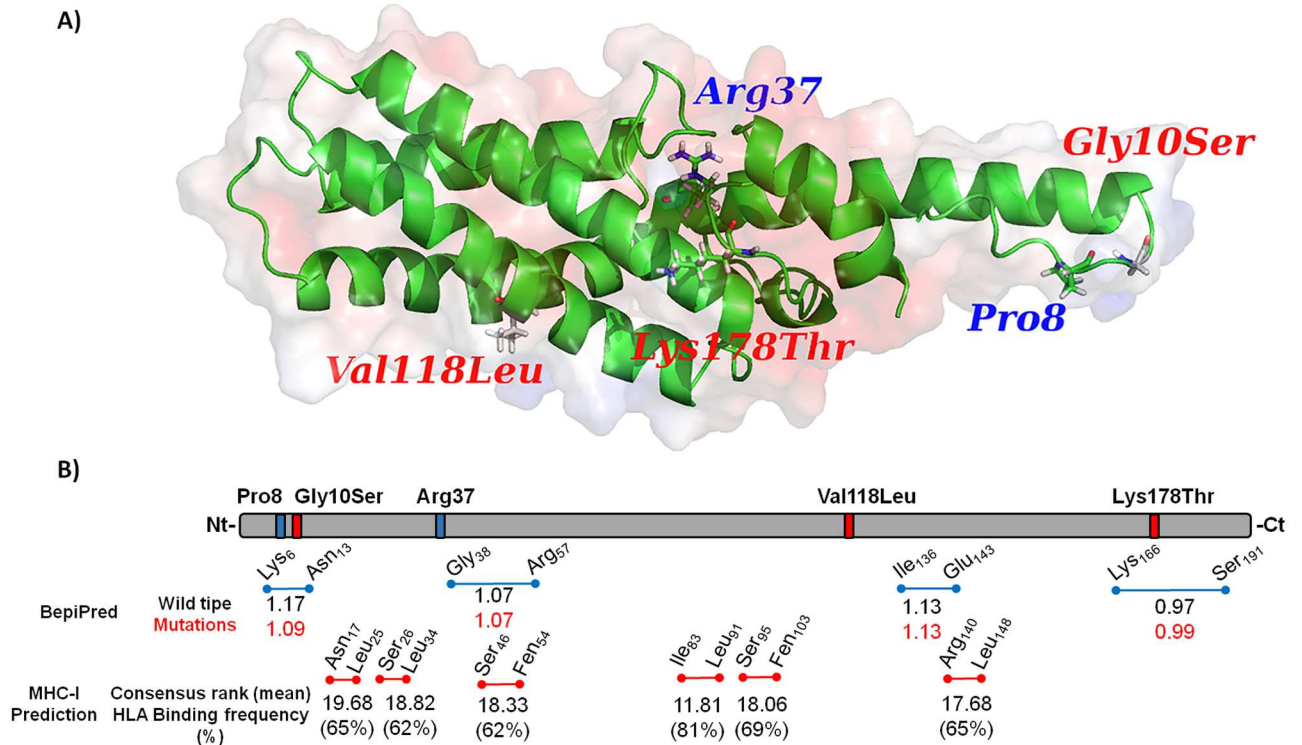


**Fig 4. Alignment of protein sequences and frequency of mutations on field isolates.** (A) CelTOS protein derivatives from *P. vivax* genome. The yellow mers represent the reference strain and the red mers the described mutate amino acid. (B) Frequencies of mutations in isolates from different Brazilian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

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g004

### Non-synonymous mutations could modify the potential of predicted B-cell epitopes but not for T<sub>CD8+</sub> epitopes.

Fig 5a depicts the electrostatic potential around the mutations. The region encompassing Arg37 shows a strong negatively charged surface. The Lys178 position showed the same negative pattern, while Val118 and Gly10 are positively charged. Pro8 region is mostly neutral. Arg37 and Val118 are part of a stable alpha helix structure, whereas Pro8, Gly10, and Lys178 belong to flexible loop structures. Also, all residues are exposed to the surface, except Arg37 which is hidden inside the negative pocket. As shown in Fig 5b four high scored potential linear epitopes with at least eight amino acids were identified in the entire protein sequence (Lys6-Asn13; Gly38-Arg57; Ile136-Glu143 and Lys166-Ser191). The prediction scores ranged from 0.97 to 1.17 and no immunodominant epitopes could be identified by this approach. Considering that two of non-synonymous mutations were inserted in predicted B-cell linear epitopes (Gly10Ser and Lys178Thr), we analyzed the prediction scores of mutate epitopes. Interestingly, the C-terminal mutation Lys178Thr, observed only in Asian strains, North Korean (KMZ96916.1) and Indian VII (KMZ78086.1), resulted in a slight increase of the predicted score; while the N-terminal mutation Gly10Ser, observed in our Brazilian isolates Ser10-Val118 and Ser10-Leu118, resulted in a decrease of the predicted score for an epitope (Fig 5b). On the other hand, the predicted T<sub>CD8+</sub> epitopes were conserved among all known strains and isolates, once non-synonymous mutations were not observed inside these epitopes. Analyzing the full sequence of PvCelTOS, six T<sub>CD8+</sub> predicted epitopes presented consensus score smaller than 20 and were predicted to be recognized by more than 60% of analyzed HLA (Fig 5b). Among these epitopes, the sequence RVSEDAYFL (PvCelTOS<sub>183-191</sub>) was considered a potential promiscuous T<sub>CD8+</sub> epitope, since it was predicted as bonded by 81% of evaluated HLAs and presented a mean consensus score of 11.81. However, the potential of predicted epitopes as target of immune response and the effects of mutations on immune response against PvCelTOS remain unexplored.



**Fig 5. Modeling structure and *In silico* analysis of PvCelTOS.** (A) Synonymous and non-synonymous mutations were illustrated by blue title and red title, respectively, on 3D structure of PvCelTOS. The red and blue clouds represent the negative and positive surface, respectively. (B) Synonymous and non-synonymous mutations found in our population and other described mutations are illustrated by blue bars and red bars, respectively, on PvCelTOS structure. The blue lines represent predicted linear B-cell epitopes and the red lines represent predicted T<sub>CD8+</sub> epitopes. On both (B and T predicted epitopes) the letter and number of each epitope indicate the C-terminal and N-terminal amino acid. The BepiPred values represent the predicted score of linear B-cell epitope in wild type haplotype (H1) and mutate strain (red number). The IEDB MHC-I indicates the mean binding prediction score of T<sub>CD8+</sub> epitopes and respective HLA binding frequency among 27 evaluated HLA. No differences of prediction T-cell epitopes are observed between wild types or mutate PvCelTOS.

doi:10.1371/journal.pntd.0005344.g005

## Discussion

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



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

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

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

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

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

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

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

### Genes and protein sequences used

*Plasmodium vivax* pvCelTOS mRNA for Pv cell-traversal protein, complete CDs. Accession number: AB194053.1; S4 [*Plasmodium vivax* Sal-1] Accession number: XP\_001617263.1; Hypothetical protein PVBG\_00206 [*Plasmodium vivax* Brazil I] Accession number: KMZ84426.1; Hypothetical protein PVNG\_01740 [*Plasmodium vivax* North Korean] Accession number: KMZ 96916.1; Hypothetical protein PVIIG\_00773 [*Plasmodium vivax* India VII] Accession number: KMZ 78086.1

### Acknowledgments

We are grateful to all individuals who participated in this study, for their cooperation and generous donation of blood, which made this study possible. To the sequencing platform of the Program for Technological Development of Health Products (PDTIS-Fiocruz) for use of their facilities.

### Author Contributions

**Conceptualization:** JdCLJ DMB LRPR LBC.

**Formal analysis:** LBC GCC JdCLJ RNRdS JHMdS.

**Investigation:** LBC DdSPdS RNRdS JHMdS.

**Methodology:** LBC RNRdS DdSPdS GCC JHMdS.

**Resources:** DMB RLDM JdCLJ.

**Writing – original draft:** LBC RNRdS JdCLJ.

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

### References

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



4. Mueller I, Taime J, Ibam E, Kundi J, Lagog M, et al. (2002) Complex patterns of malaria epidemiology in the highlands region of Papua New Guinea. *P N G Med J* 45: 200–205. PMID: [12968790](#)
5. Ferraro B, Talbott KT, Balakrishnan A, Cisper N, Morrow MP, et al. (2013) Inducing humoral and cellular responses to multiple sporozoite and liver-stage malaria antigens using exogenous plasmid DNA. *Infect Immun* 81: 3709–3720. doi: [10.1128/IAI.00180-13](#) PMID: [23897618](#)
6. Draper SJ, Angov E, Horii T, Miller LH, Srinivasan P, et al. (2015) Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *Vaccine* 33: 7433–7443. doi: [10.1016/j.vaccine.2015.09.093](#) PMID: [26458807](#)
7. Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M (2006) CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol Microbiol* 59: 1369–1379. doi: [10.1111/j.1365-2958.2005.05024.x](#) PMID: [16468982](#)
8. Anum D, Kusi KA, Ganeshan H, Hollingdale MR, Ofori MF, et al. (2015) Measuring naturally acquired ex vivo IFN-gamma responses to *Plasmodium falciparum* cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) in Ghanaian adults. *Malar J* 14: 20. doi: [10.1186/s12936-014-0539-5](#) PMID: [25604473](#)
9. Bergmann-Leitner ES, Mease RM, De La Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, et al. (2010) Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from *Plasmodium falciparum* elicits cross-species protection against heterologous challenge with *Plasmodium berghei*. *PLoS One* 5: e12294. doi: [10.1371/journal.pone.0012294](#) PMID: [20808868](#)
10. Bergmann-Leitner ES, Legler PM, Savranskaya T, Ockenhouse CF, Angov E (2011) Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CelTOS. *Vaccine* 29: 5940–5949. doi: [10.1016/j.vaccine.2011.06.053](#) PMID: [21722682](#)
11. Kusi KA, Bosomprah S, Dodoo D, Kyei-Baafour E, Dickson EK, et al. (2014) Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. *Malar J* 13: 103. doi: [10.1186/1475-2875-13-103](#) PMID: [24635830](#)
12. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Diaz E, Dunachie S, Kumpitak C, et al. (2015) Acquisition and Longevity of Antibodies to *Plasmodium vivax* Preerythrocytic Antigens in Western Thailand. *Clin Vaccine Immunol* 23: 117–124. doi: [10.1128/CVI.00501-15](#) PMID: [26656115](#)
13. Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gemmill AW, et al. (2004) Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 52: 159–168. doi: [10.1111/j.1365-2958.2003.03974.x](#) PMID: [15049818](#)
14. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, et al. (2010) Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115. doi: [10.1186/1475-2875-9-115](#) PMID: [20433744](#)
15. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, et al. (2007) Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 6: 167. doi: [10.1186/1475-2875-6-167](#) PMID: [18093292](#)
16. Pratt-Riccio LR, Sallenave-Sales S, de Oliveira-Ferreira J, da Silva BT, Guimaraes ML, et al. (2008) Evaluation of the genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* P126 protein (SERA or SERP) and its influence on naturally acquired specific antibody responses in malaria-infected individuals living in the Brazilian Amazon. *Malar J* 7: 144. doi: [10.1186/1475-2875-7-144](#) PMID: [18667071](#)
17. Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, et al. (2009) Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins* 77 Suppl 9: 89–99.
18. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410. doi: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](#) PMID: [2231712](#)
19. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402. PMID: [9254694](#)
20. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, et al. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42: D222–230. doi: [10.1093/nar/gkt1223](#) PMID: [24288371](#)
21. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10037–10041. doi: [10.1073/pnas.181342398](#) PMID: [11517324](#)
22. Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2: 2. doi: [10.1186/1745-7580-2-2](#) PMID: [16635264](#)
23. Kim Y, Ponomarenko J, Zhu Z, Tamang D, Wang P, et al. (2012) Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Res* 40: W525–530. doi: [10.1093/nar/gks438](#) PMID: [22610854](#)
24. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lamberth K, et al. (2003) Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci* 12: 1007–1017. doi: [10.1110/ps.0239403](#) PMID: [12717023](#)

25. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, et al. (2008) NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. *Nucleic Acids Res* 36: W509–512. doi: [10.1093/nar/gkn202](https://doi.org/10.1093/nar/gkn202) PMID: [18463140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18463140/)
26. Peters B, Sette A (2005) Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics* 6: 132. doi: [10.1186/1471-2105-6-132](https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-132) PMID: [15927070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15927070/)
27. Sidney J, Assarsson E, Moore C, Ngo S, Pinilla C, et al. (2008) Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immunome Res* 4: 2. doi: [10.1186/1745-7580-4-2](https://doi.org/10.1186/1745-7580-4-2) PMID: [18221540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18221540/)
28. Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497. PMID: [14668244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14668244/)
29. Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595. PMID: [2513255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2513255/)
30. Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564–567. doi: [10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x) PMID: [21565059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21565059/)
31. Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF (1993) Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol* 59: 1–14. PMID: [8515771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8515771/)
32. Mann VH, Huang T, Cheng Q, Saul A (1994) Sequence variation in the circumsporozoite protein gene of *Plasmodium vivax* appears to be regionally biased. *Mol Biochem Parasitol* 68: 45–52. PMID: [7891747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7891747/)
33. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S (1997) Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. *Mol Biochem Parasitol* 84: 49–56. PMID: [9041520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9041520/)
34. Sousa TN, Ceravolo IP, Fernandes Fontes CJ, Couto A, Carvalho LH, et al. (2006) The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Mol Biochem Parasitol* 146: 251–254. doi: [10.1016/j.molbiopara.2005.11.006](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.11.006) PMID: [16384615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16384615/)
35. Figtree M, Pasay CJ, Slade R, Cheng Q, Cloonan N, et al. (2000) *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. *Mol Biochem Parasitol* 108: 53–66. PMID: [10802318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10802318/)
36. de Souza-Neiras WC, de Melo LM, Machado RL (2007) The genetic diversity of *Plasmodium vivax*—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 245–254. PMID: [17568928](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17568928/)
37. Zakeri S, Safi N, Afsharpad M, Butt W, Ghasemi F, et al. (2010) Genetic structure of *Plasmodium vivax* isolates from two malaria endemic areas in Afghanistan. *Acta Trop* 113: 12–19. doi: [10.1016/j.actatropica.2009.08.025](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.08.025) PMID: [19716798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19716798/)
38. Auburn S, Bohme U, Steinbiss S, Trimarsanto H, Hostetler J, et al. (2016) A new *Plasmodium vivax* reference sequence with improved assembly of the subtelomeres reveals an abundance of pir genes. *Wellcome Open Res* 1: 4. doi: [10.12688/wellcomeopenres.9876.1](https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.9876.1) PMID: [28008421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28008421/)
39. Chamary JV, Parmley JL, Hurst LD (2006) Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet* 7: 98–108. doi: [10.1038/nrg1770](https://doi.org/10.1038/nrg1770) PMID: [16418745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16418745/)
40. Plotkin JB, Kudla G (2011) Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* 12: 32–42. doi: [10.1038/nrg2899](https://doi.org/10.1038/nrg2899) PMID: [21102527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21102527/)
41. Schattner P, Diekhans M (2006) Regions of extreme synonymous codon selection in mammalian genes. *Nucleic Acids Res* 34: 1700–1710. doi: [10.1093/nar/gkl095](https://doi.org/10.1093/nar/gkl095) PMID: [16556911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16556911/)
42. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C (2011) Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* 12: 683–691. doi: [10.1038/nrg3051](https://doi.org/10.1038/nrg3051) PMID: [21878961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21878961/)
43. Verra F, Hughes AL (2000) Evidence for ancient balanced polymorphism at the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 105: 149–153. PMID: [10613707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10613707/)
44. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Diaz E, Dunachie S, Kumpitak C, et al. (2016) Acquisition and Longevity of Antibodies to *Plasmodium vivax* Preerythrocytic Antigens in Western Thailand. *Clin Vaccine Immunol* 23: 117–124.
45. Kiwanuka GN (2009) Genetic diversity in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997–2007. *J Vector Borne Dis* 46: 1–12. PMID: [19326702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19326702/)

46. Kang JM, Lee J, Cho PY, Moon SU, Ju HL, et al. (2015) Population genetic structure and natural selection of apical membrane antigen-1 in *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malar J* 14: 455. doi: [10.1186/s12936-015-0942-6](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0942-6) PMID: [26572984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26572984/)
47. Valizadeh V, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND (2014) Population genetics and natural selection in the gene encoding the Duffy binding protein II in Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Infect Genet Evol* 21: 424–435. doi: [10.1016/j.meegid.2013.12.012](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.012) PMID: [24384095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24384095/)
48. Kosuwin R, Putaporntip C, Tachibana H, Jongwutiwes S (2014) Spatial variation in genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein locus of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). *PLoS One* 9: e110463. doi: [10.1371/journal.pone.0110463](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110463) PMID: [25333779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25333779/)

## 8.2 Artigo II



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

## OPEN ACCESS

### Edited by:

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

### Reviewed by:

Manuel Alfonso Patarroyo,  
Fundación Instituto de Inmunología  
de Colombia (FIDIC), Colombia  
Daniel Youssef Bargieri,  
University of Sao Paulo, Brazil

### \*Correspondence:

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

### Specialty section:

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

**Received:** 10 November 2016

**Accepted:** 17 January 2017

**Published:** 07 February 2017

### Citation:

Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF,  
Lopez-Camacho C,  
Martins da Silva JH,  
Perce-da-Silva DS, Têva A,  
Ramos Franco AM, Pinheiro FG,  
Chaves LB, Pratt-Riccio LF,  
Reyes-Sandoval A, Banic DM and  
Lima-Junior JC (2017) *Plasmodium*  
*vivax* Cell-Traversal Protein for  
Ookinetes and Sporozoites: Naturally  
Acquired Humoral Immune Response  
and B-Cell Epitope Mapping in  
Brazilian Amazon Inhabitants.  
*Front. Immunol.* 8:77.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.00077

Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva<sup>1</sup>, Isabela Ferreira Soares<sup>1</sup>, Cesar Lopez-Camacho<sup>2</sup>, João Herminio Martins da Silva<sup>3</sup>, Daiana de Souza Perce-da-Silva<sup>4</sup>, Antônio Têva<sup>5</sup>, Antônia Maria Ramos Franco<sup>6</sup>, Francimeire Gomes Pinheiro<sup>6</sup>, Lana Bitencourt Chaves<sup>1</sup>, Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>7</sup>, Arturo Reyes-Sandoval<sup>2</sup>, Dalma Maria Banic<sup>4</sup> and Josué da Costa Lima-Junior<sup>1\*</sup>

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

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

exposure/protection parameters were found. However, the epitope (PvCelTOS<sub>I136-E143</sub>) was validated as a main linear B-cell epitope, as 92% of IgG responders to PvCelTOS were also responders to this peptide sequence. This study describes for the first time the natural immunogenicity of PvCelTOS in Amazon individuals and identifies immunogenic regions in a full-length protein. The IgG magnitude was mainly composed of cytophilic antibodies (IgG1) and associated with recent malaria episodes. The data presented in this paper add further evidence to consider PvCelTOS as a vaccine candidate.

**Keywords:** PvCelTOS, *P. vivax*, vaccines, epitope mapping, epitope prediction, malaria vaccines, malaria

## INTRODUCTION

Malaria remains a major public health problem worldwide. It is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, being responsible for nearly 438,000 deaths and 150–300 million new infections in 2015 (1) and the reason of enormous socioeconomic impact in endemic settings (2). Among the *Plasmodium* species able to infect humans, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* are the most prevalent malaria parasites. *P. falciparum* is extremely prevalent in Africa and is responsible for the majority of cases and deaths worldwide, while *P. vivax* is the most prevalent species outside Africa (3). Despite the reduction in the number of malaria cases and deaths over the past decade (1), the emergence of drug resistance and the significant ongoing burden of morbidity and mortality emphasize the need for an effective malaria vaccine. Unfortunately, potential *P. vivax* vaccine candidates lag far behind those for *P. falciparum* (4). Currently, besides the RTS, S vaccine, there are 30 candidate vaccine formulations in clinical trials against *P. falciparum*, while there is only one against *P. vivax* (5). These data allied to the impact caused by the high *P. vivax* prevalence (2), the severity of the disease (6–11), and the emergence of strains resistant to chloroquine (12–14) and primaquine (15–17), reiterate the importance of identifying and exploring the potential of vaccine candidates against *P. vivax* as an essential step in the development of a safe and affordable vaccine.

Malaria liver-stage vaccines are one of the leading strategies and the only approach that has demonstrated complete, sterile protection in clinical trials. Therefore, vaccines targeting sporozoite and liver-stage parasites, when parasite numbers are low, can lead to the elimination of the parasite before it advances to the symptomatic stage of the disease (18). Corroborating this idea, the sterile protection against *P. falciparum* by immunization with radiation-attenuated sporozoites was demonstrated in several studies (19–21) and the protection lasted for at least 10 months and extended to heterologous strain parasites (22). Based on these findings, sporozoite surface antigens are one of the most promising vaccine targets against malaria, to protect and prevent the symptoms and block its transmission. To date, RTS,S, the subunit vaccine consisting of a portion of *P. falciparum* circumsporozoite protein (CSP), conferred partial protection in Phase III trials and fell short of community-established vaccine efficacy goals (23–26). Conversely, Gruner and collaborators have demonstrated that the sterile protection against sporozoites can be obtained in the absence of specific immune responses to

CSP (27). In addition, a recent study found 77 parasite proteins associated with sterile protection against irradiated sporozoites (28). Collectively, these data reinforce the concept that a multi-valent anti-sporozoite vaccine targeting several surface-exposed antigens would induce a higher protection efficacy.

In this scenario, cell-traversal protein of *Plasmodium* ookinetes and sporozoites, a highly conserved protein among *Plasmodium* species, emerged as a novel target in the development of a vaccine against *Plasmodium* parasites (29). This secretory microneme protein is translocated to the sporozoites and ookinetes surface, being necessary for sporozoites and ookinetes to break through cellular barriers and establish infection in the new host, having a crucial role on cell-transversal ability in both stages (29, 30). The disruption of the genes encoding CelTOS in *Plasmodium berghei* reduces the infectivity in the mosquito host and also the infectivity of the sporozoite in the liver, almost eliminating their ability to cell pass (29). Interestingly, *P. falciparum* CelTOS (PfCelTOS) was naturally recognized by acquired antibodies in exposed populations (31), able to induce cross-reactive immunity against *P. berghei* and inhibit sporozoite motility and invasion of hepatocytes *in vitro* (32). However, the knowledge about *P. vivax* CelTOS (PvCelTOS) has remained limited. Only recently, a study reported PvCelTOS as naturally immunogenic in infected individuals from Western Thailand. Our group, investigating the genetic diversity of genes encoding PvCelTOS in field isolates from five different regions of the Amazon forest, reveals a high-conserved profile. Together, both findings support the potential of PvCelTOS as an interesting target on *P. vivax* sporozoite surface, but further studies are still necessary to consolidate this protein as an alternative in future multitarget vaccines. Therefore, the present study aimed at evaluating the naturally acquired humoral immune response against PvCelTOS in exposed populations from Brazilian Amazon, determining the antibody subclass profile, identifying its B-cell epitopes and verifying the existence of associations between the specific IgG and subclass response against PvCelTOS and epidemiological data that can reflect the exposition and/or protection degree.

## PARTICIPANTS AND METHODS

### Study Area and Volunteers

A cross-sectional cohort study was conducted involving 528 individuals from Rio Preto da Eva (2°50'50"S/59°56'28"W), located north of the Amazon River and 80 km distant from Manaus, the capital of Amazon state. This city has an area of 6,000 km<sup>2</sup>



and a population of about 22,000 people, who live in rural areas inside the forests. Transmission of malaria in the Amazon occurs throughout the whole year, with seasonal fluctuations with maximum transmission occurring during the dry season from May to October and prevalence of infections by *P. vivax*, responsible for more than 85% of reported malaria cases.

Samples and survey data were collected from November 2013 to March 2015. In addition, we also included, as control subjects, 10 naive individuals living in Manaus, and with no reported previous malaria episodes. Written informed consent was obtained from all adult donors or from parents of donors in the case of children. The study was reviewed and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil.

## Epidemiological Survey

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

## Malaria Diagnosis and Blood Sampling

Venous peripheral blood was drawn into heparinized tubes and plasma collected after centrifugation ( $350 \times g$ , 10 min). Plasma samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and transported to our laboratory. Thin and thick blood smears of all donors were examined for malaria parasites. Parasitological evaluations were done by examination of 200 fields at  $1,000\times$  magnification under oil-immersion and a research expert in malaria diagnosis examined all slides. Donors positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated using the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

## Recombinant PvCelTOS Expression in HEK-293T Cells

As previously described (33), the *P. vivax* sequence for CelTOS (Salvador I; Uniprot accession number Q53UB7) was cloned in the expression vector pHLsec, which is flanked by the chicken  $\beta$ -actin/rabbit  $\beta$ -globin hybrid promoter with a signal secretion sequence and a Lys-His6 tag. The protein was expressed upon transient transfection in HEK-293T cells with endotoxin-free plasmids in roller bottles ( $2,125\text{ cm}^2$ ). The secreted protein was purified from the supernatant by immobilized Ni Sepharose affinity chromatography. The presence of proteins in the elution samples was confirmed using 6xHis epitope tag antibody [horseradish peroxidase (HRP) conjugate] in a Western blot. The sample was concentrated using an Amicon Ultra centrifugal filter system (Life Technologies) until reaching 10 ml of final volume. Contaminant proteins and salts were removed from the concentrate by size exclusion purification (SEC) using Superdex

medium in the column. Protein concentration after recovery was tested using a Bradford protein assay, and purity was assessed by silver staining and by Western blotting.

## Antibody Assays

Anti-PvCelTOS specific antibodies were evaluated on plasma samples from 528 exposed individuals from Brazilian Amazon and 10 healthy individuals, who had no reported malaria episodes, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), essentially as previously described (33, 34). Briefly, MaxiSorp 96-well plates (Nunc, Rochester, NY, USA) were coated with PBS containing  $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  of recombinant protein. After overnight incubation at  $4^{\circ}\text{C}$ , the plates were washed and blocked for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Individual plasma samples diluted 1:100 in PBS-Tween containing 5% non-fat dry milk (PBS-Tween-M) were added in duplicate wells. After 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and three washings with PBS-Tween, bound antibodies were detected with peroxidase-conjugated goat antihuman IgG (Sigma, St. Louis) and followed by addition of *o*-phenylenediamine and hydrogen peroxide. Optical density was identified at 492 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The results for total IgG were expressed as reactivity indexes (RIs), which were calculated by the mean optical density of an individual's tested sample divided by the mean optical density of 10 non-exposed control individuals' samples plus 3 standard deviations. Subjects were scored as responders to PvCelTOS if the RI of IgG against the recombinant protein was higher than 1. Additionally, the RIs of IgG subclasses were evaluated on responders individuals by a similar method, using peroxidase-conjugated goat antihuman IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (Sigma, St. Louis).

## B Cell Epitope Prediction on PvCelTOS

The prediction of linear B-cell epitopes was carried out using the program BepiPred (35), which is based on hidden Markov model profiles of known antigens, and also incorporates hydrophilicity and secondary structure prediction. For each input FASTA sequence, the server outputs a prediction score for each amino acid. The recommended cutoff of 0.35 was used to determine potential B-cell linear epitopes, ensuring sensibility of 49% and specificity of 75% to this approach. Linear B-cell epitopes are predicted to be located at the residues with the highest scores. In this study, BepiPred was used to predict B-cell linear epitopes and to evaluate the prediction value of peptides containing short amino acid sequences of PvCelTOS.

The Emini surface accessibility (ESA) was used to evaluate the probability of predicted linear B-cell epitopes to be exposed on the surface of the protein. This approach calculates the surface accessibility of hexapeptides and values greater than 1.0 indicate an increased probability of being found on the surface (36). Sequences with BepiPred score above 0.35 and ESA score above 1.0 were considered potential linear B-cell epitopes in regions that could be accessed by naturally acquired antibodies.

## B-Cell Epitope Mapping of PvCelTOS

A peptide library of 32 PvCelTOS synthetic 15-mer peptides overlapping by nine amino acids (GenOne Biotechnologies; purity 95% based on HPLC) was synthesized. To evaluate the specific

response to each peptide, the peptide array was performed using MaxiSorp 96-well plates (Nunc, Rochester, NY, USA) coated with PBS containing 5 µg/ml of each peptide in duplicates. After overnight incubation at 4°C, the plates were washed with PBS and blocked with PBS-Tween containing 5% non-fat dry milk (PBS-Tween-M) for 1 h at 37°C. Individual plasma samples were diluted 1:100 with PBS-Tween-M and added in duplicate wells for each sequence and the plates incubated at room temperature for 1 h. After three washings with PBS-Tween, bound antibodies were detected with peroxidase-conjugated goat antihuman IgG (Sigma, St. Louis) followed by addition of *o*-phenylenediamine and hydrogen peroxide. The absorbance was read at 492 nm using an ELISA reader (Spectramax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The results for total IgG were expressed as RIs, which were calculated by the mean optical density of the tested samples plus 3 standard deviations of pools of control individuals. Subjects were scored as positive if the RI was higher than 1.

## Root Mean Square Fluctuation (RMSF) and Electrostatic Potential Surface Calculation

Molecular dynamics simulations were carried out using GROMACS 5.1.2 (37) software package. Gromos53a6 (38) force field was used. Simple point charge water model (39) was used to solvate the system. Charges were neutralized using Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions. Steepest descent method was used for energy minimization. Further, 100 ps temperature equilibration was carried out at a temperature of 300 K in the presence of position restraints of 1,000 KJ/mol and the pressure coupling of 1,000 ps at 1 bar of atmospheric pressure. After equilibration, the simulation of 200,000 ps (200 ns) without position restraints was carried out. All simulations were run three times, and consistent results were recorded. RMSF was analyzed from simulation trajectory using GROMACS utilities. The Electrostatic potential surface for the PvCelTOS was calculated using APBS (40) and visualized in PyMOL (Pymol LLC) and the electrostatic potential surfaces for the contours from  $-3kT/e$  (red) to  $+3kT/e$  (blue) were visualized. The figures were rendered using PyMol.

## Statistical Analysis

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

## RESULTS

### Epidemiological Profile of Studied Individuals

Most studied individuals were adults and naturally exposed to malaria infection throughout the years (Table 1). Age ranged

**TABLE 1 | Summary of the epidemiological data of the studied population.**

	Overall	PvCelTOS IgG responders	PvCelTOS IgG non-responders (NRs)
<b>Gender—<i>N</i> (%)</b>			
Male	284 (53.8%)	55 (58.5%)	229 (52.8%)
Female	244 (46.2%)	39 (41.5%)	205 (47.2%)
Total	528	94	434
<b>Malaria exposure—median (IR)</b>			
Age (years)	36 (25–50)	38 (21–55.5)	36 (21–50)
Time of residence in endemic area (years)	33 (19–49)	35 (21–55)	33 (19–48)
Number of previous malaria episodes ( <i>n</i> )	4 (2–10)	4.5 (2–10)	4 (2–10)
Time since the last malaria episode (months)	51 (24–91)	60 (13.7–89.2)	51 (24–90.5)
Frequency of recent malaria episodes (%)	12.7%	16.0%	13.1%
<b>Previous malaria species contracted—<i>N</i> (%)</b>			
Never infected	7 (1.3%)	0 (0%)	7 (1.6%)
<i>Plasmodium falciparum</i>	32 (6.1%)	5 (5.3%)	27 (6.2%)
<i>Plasmodium vivax</i>	125 (23.7%)	25 (26.6%)	100 (23%)
Both species	158 (29.9%)	31 (33%)	127 (29.3)
Not reported/remember	206 (39%)	33 (35.1%)	173 (39.9%)

Values of age, time of residence in endemic areas, number of previous malaria episodes, and time elapsed from the last malaria episode represent the median (interquartile range), while the parameter “frequency of recent malaria episodes” represents the percentage of individuals who reported malaria episode in the last year. The frequency of individuals who present recent malaria episodes was compared by Fisher's test, and other epidemiological parameters were compared by Mann–Whitney test. No statistical difference was observed between epidemiological parameters of responders and NR individuals.

from 10 to 89 years with an average of 36.9. The proportion of men was significantly higher (53.8%) than for women (46.2%;  $\chi^2 = 5.761$ ,  $p < 0.0164$ ). Regarding the previous personal history of malaria, only seven individuals reported no malaria episode (1.3%). Among those who remembered the *Plasmodium* species, the majority (29.9%) reported infections by *P. falciparum* and *P. vivax*. The number of past malaria episodes also varied greatly among donors, ranging from 0 to 50 (mean =  $7.74 \pm 16.5$ ). Finally, the time elapsed since the last malaria episode ranged from 0 to 480 months (mean =  $71.7 \pm 77.9$ ). Interestingly, a correlation trend was observed between the time of residence in the endemic area and the number of previous malaria infections ( $p = 0.0003$ ;  $r = 0.153$ ). Collectively, the epidemiological inquiry indicated that the studied population had different degrees of exposure and/or immunity.

### PvCelTOS Is Naturally Immunogenic with the Prevalence of Cytophilic Antibodies in Brazilian Amazon Individuals

To test if the PvCelTOS is a target for naturally acquired antibodies in Amazon individuals, we first assessed the IgG reactivity profile against the recombinant protein. The plasma samples collected from the 528 individuals living in the endemic area reveal a low frequency of responders to PvCelTOS, since only 17.8% of the studied population (94 individuals) presented



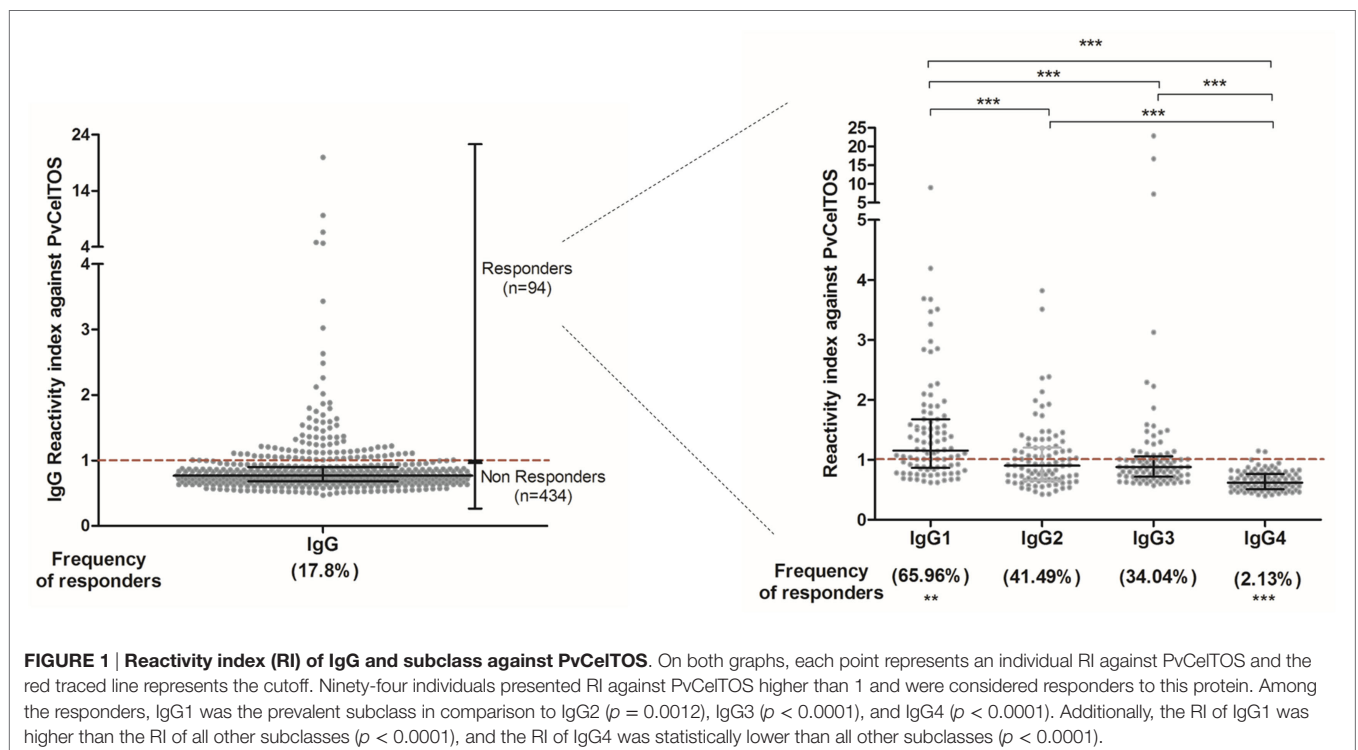
specific IgG antibodies against the protein. Interestingly, the epidemiological data were similar between responders and NRs against this protein (**Table 1**). On both groups, responders and NRs, the age, time of residence in endemic area, the number of previous malaria episodes, the number of recent malaria episodes, the frequency of individuals with recent malaria episodes, and months elapsed from the last malaria episode were similar ( $p > 0.05$ ).

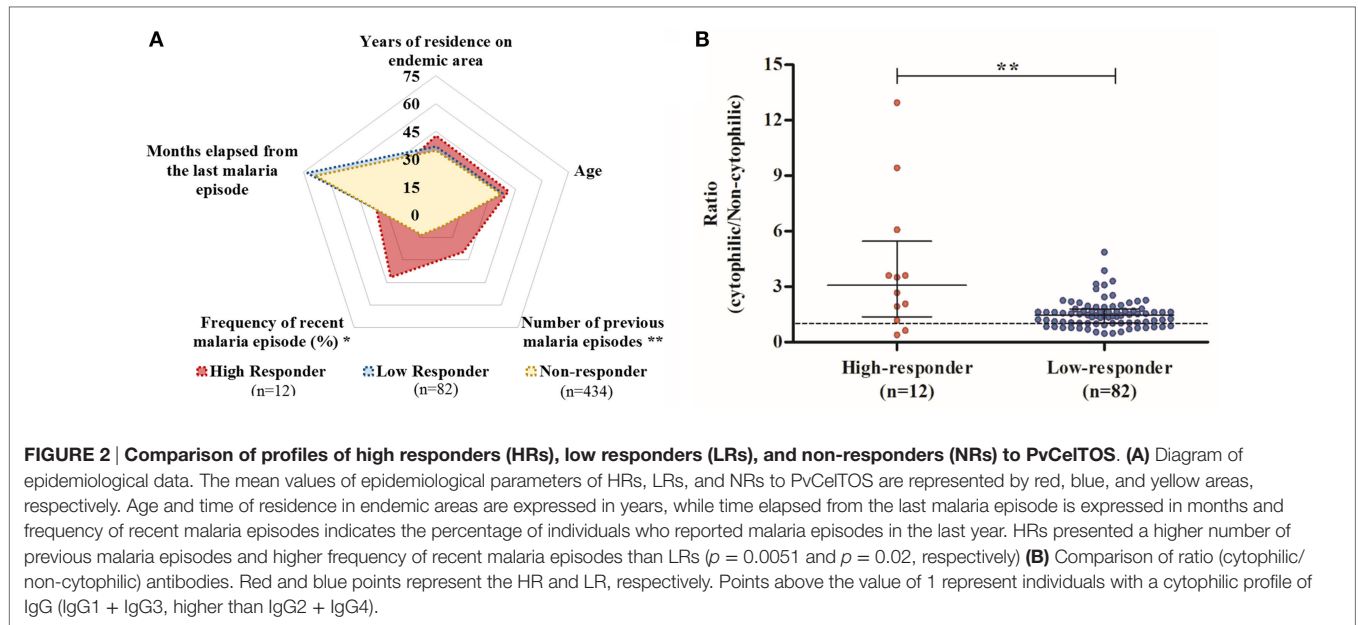
Among the group of responders to PvCelTOS, the RI ranged from 1.01 to 19.93 (median = 1.205; interquartile range = 1.082; 1.552), reflecting a wide spectrum in magnitude of naturally acquired IgG response. The IgG subclass profile was marked by IgG1, the most prevalent subclass, present in 65.96% of responders, and with major RI (median = 1.15; interquartile range = 0.86–1.68) compared to IgG2 (median = 0.9; interquartile range = 0.66–1.2), IgG3 (median = 0.88; interquartile range = 0.72–1.06), and IgG4 (median = 0.62; interquartile range = 0.51–0.76) (**Figure 1**). Moreover, IgG3 RIs were directly correlated to the number of recent malaria episodes ( $p = 0.003$ ;  $r = 0.315$ ; Figure S1A in Supplementary Material) and inversely associated with the time elapsed from the last malaria episode ( $p = 0.031$ ;  $r = -0.258$ ; Figure S1B in Supplementary Material).

## High IgG RIs against PvCelTOS Are Driven by Cytophilic Antibodies and Associated with Recent Infections

In order to identify possible factors that could be associated with this large spectrum of reactivity against PvCelTOS in IgG-positive

individuals, we explored epidemiological data among responders. Initially, we observed that the RI against PvCelTOS was directly correlated with the number of previous malaria episodes ( $p = 0.047$ ;  $r = 0.227$ ; Figure S1C in Supplementary Material) and inversely correlated with the time elapsed from the last malaria episode ( $p = 0.045$ ;  $r = -0.24$ ; Figure S1D in Supplementary Material). Based on these findings, responder individuals were divided into two subgroups: high responders (HRs; individuals who had RI of IgG against PvCelTOS higher than 2) and low responders (LRs; individuals who had RI of IgG against PvCelTOS between 1 and 2). **Figure 2A** illustrates the means of epidemiological parameters of HRs, LRs, and NRs to PvCelTOS. Interestingly, while NRs and LRs presented a very similar profile of epidemiological parameters, HRs presented a statistically higher number of previous malaria episodes in comparison to NR and LR ( $p = 0.0058$ ;  $p = 0.0051$ , respectively). Moreover, despite no statistical differences could be observed on the time elapsed from the last malaria episode ( $p = 0.15$  in ANOVA test), the frequency of individuals who reported recent episodes of malaria was higher in HR (41.6%) than LR (12%,  $p = 0.02$ ) and NR (13.1%,  $p = 0.016$ ). Moreover, the proportion of RIs of cytophilic over non-cytophilic antibodies (IgG1 + IgG3/IgG2 + IgG4) presented direct correlation with RI of IgG of responder individuals ( $p = 0.0016$ ;  $r = 0.32$ ), suggesting that higher RI could be associated with a cytophilic profile of humoral response against PvCelTOS. Interestingly, although the proportion of individuals with cytophilic profile was similar in both groups, HR and LR (83% and 78%, respectively), the ratio of (cytophilic/non-cytophilic) antibodies was significantly higher in HR than LR ( $p = 0.0076$ ) (**Figure 2B**).





## Five Immunogenic Regions Identified in PvCelTOS and Two Linear B-Cell Epitopes Broadly Recognized by Naturally Acquired IgG Antibodies

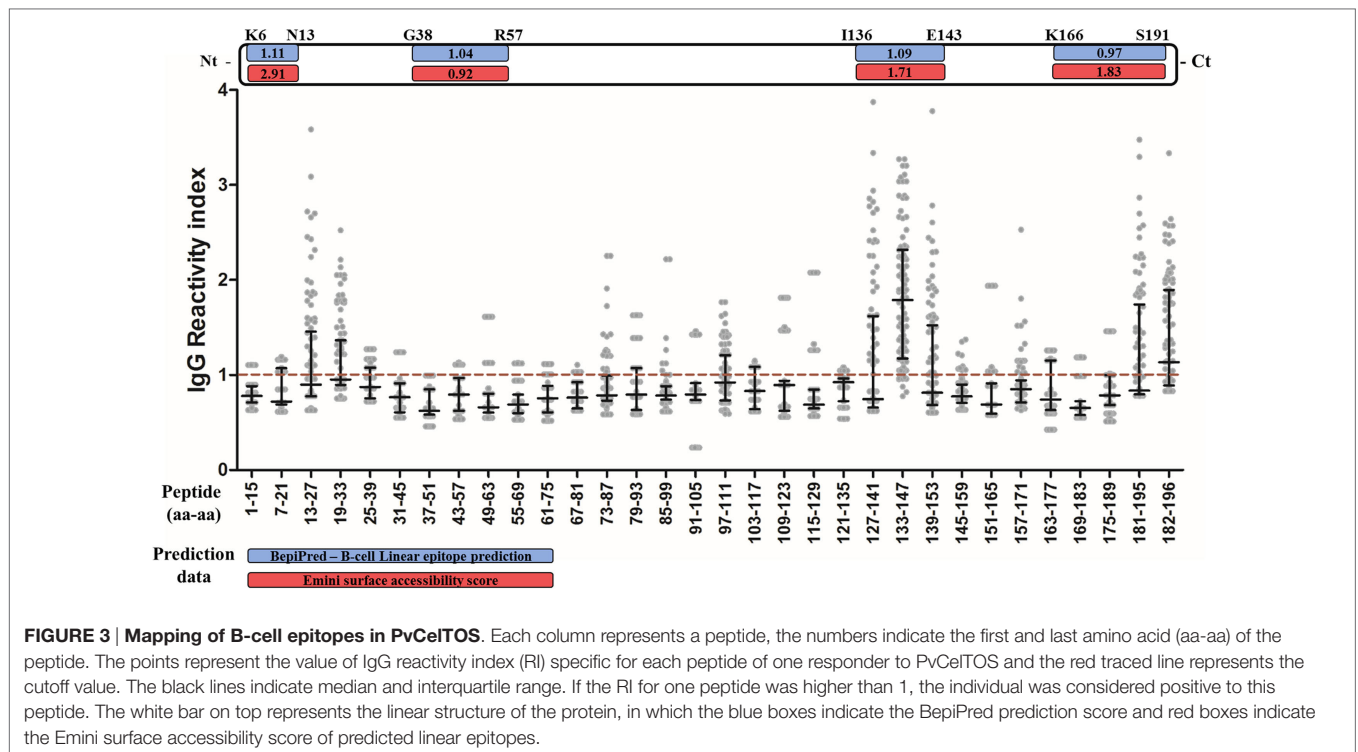
Four B-cell linear epitopes were predicted *in silico* in the entire sequence of PvCelTOS (PvCelTOS<sub>K6-N13</sub>; PvCelTOS<sub>G38-R57</sub>; PvCelTOS<sub>I136-E143</sub>; PvCelTOS<sub>K166-S191</sub>).

In order to validate the prediction data and identify possible non-predicted immunogenic regions of PvCelTOS, plasma from IgG responders to PvCelTOS was tested against 32 overlapping peptides corresponding to the complete amino acid sequence. First, 10 peptides (N13-L27; S19-V33; E73-I87; L79-K93; S97-A111; P127-V141; I133-G147; P139-V153; L181-L195; E182-D196) were broadly recognized by responders to PvCelTOS (Figure 3). Two of the predicted epitopes (PvCelTOS<sub>I136-E143</sub> and PvCelTOS<sub>K166-S191</sub>) were present (partially or entirely) in peptides confirmed as naturally immunogenic. Interestingly, peptides I133-G147 and E182-D196 were recognized by IgG specific antibodies of responders to PvCelTOS in frequencies higher than 50% (92% and 54%, respectively) and presented median of RI higher than 1 (1.79 and 1.14, respectively). In addition, peptides P127-V141, P139-V153, and L181-L195 were located besides the most immunogenic peptides and presented overlapped sequences, which were also recognized by IgG antibodies in moderate frequencies. Peptide I133-G147 (ASTIKPPRVSEDAYF) presented the highest IgG RI ( $p < 0.0001$  by ANOVA test) and the highest frequency of recognition (92%) compared to all other peptides. While it contains the entire sequence of predicted epitope PvCelTOS<sub>I136-E143</sub>, peptides P127-V141 and P139-V153, which contain only the partial sequence of the predicted epitope, presented minor frequencies of recognition (38% and 39%, respectively;  $p < 0.0001$  on Fisher's exact test). The peptides L181-L195 and 186-196 were both

partially inserted in the predicted linear epitope PvCelTOS<sub>166-191</sub> and could be the immune dominant sequence of this longer predicted epitope. These data supported the prediction of linear B-cell epitopes PvCelTOS<sub>I136-E146</sub> and PvCelTOS<sub>K166-S191</sub>. Conversely, peptides N13-L27, S19-V33, and S97-A111 also presented frequency of recognition about 40% (38, 40, and 36%, respectively). After the confirmation of five immunogenic regions and two immunodominant epitopes in PvCelTOS, we also compared the RI and frequencies between HR and LR for PvCelTOS. However, no differences were found.

## Main B Cell Epitopes Are Present on PvCelTOS Surface

Peptides that presented overlapped amino acids and were recognized by more than 20% of responders to PvCelTOS (Figure 3) were grouped as immunogenic regions. All peptides inserted in identified immunogenic regions are listed in Table 2 with their respective frequencies of recognition, BepiPred and ESA scores. In this context, we identified five immunogenic regions PvCelTOS<sub>N13-V33</sub>, PvCelTOS<sub>E73-K93</sub>, PvCelTOS<sub>S97-A111</sub>, PvCelTOS<sub>P127-V153</sub>, and PvCelTOS<sub>L181-D196</sub>, in which B-cell epitopes could be inserted. Interestingly, the peptides with higher frequency of specific responders (I133-G147, L181-L195, and 182-186) presented a good combination of BepiPred and ESA score. The molecular dynamics and electrostatic potential surface of PvCelTOS indicate regions P127-V153, N13-V33, and L181-D186 as more flexible than E73-K93 and S97-A111 (Figure 4A). Regarding solvent exposure, all immunogenic regions were exposed and accessible in solution. Interestingly, the immunogenic regions L181-D196 and E73-K93 are part of a very negatively charged region, while N13-V33 and P127-V153 are in a mostly neutral-positive region (Figure 4B).



## DISCUSSION

Despite significant advances in the understanding of the biology of *Plasmodium* parasites and the immune response elicited by these pathogens, there is not yet a subunit vaccine capable of providing long-lasting protection. The cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) has been considered a potential novel alternative for a vaccine against malaria (29, 32, 41), but the knowledge on *P. vivax* CelTOS potential remains scarce. Unfortunately, many conventional vaccinology strategies applied to *P. falciparum* are especially difficult when dealing with non-cultivable microorganisms such as *P. vivax*. Consequently, seroepidemiological studies have played a significant role in the identification and validation of *P. vivax* vaccine candidates (42–48). Therefore, we confirmed the naturally acquired humoral response against PvCelTOS (IgG and IgG subclass) and identified five B-cell epitopes along the entire PvCelTOS amino acid sequence, which were recognized by IgG antibodies from malaria-exposed populations from Brazilian Amazon.

Plasma samples were collected in three cross-sectional studies with Brazilian Amazon communities between 2013 and 2015. The profile of the studied individuals shows that our population included rainforest region natives and migrants from non-endemic areas of Brazil who had lived in the area for more than 10 years. The majority of individuals reported a prior experience with *P. vivax* and/or *P. falciparum* malaria. Concerning malaria history, the highly variable range of number of previous infections, time of residence in endemic areas, and time since the last infection suggests differences in exposure and immunity, since it is well known that the acquisition of clinical immunity mediated by antibodies depends on continued exposure to the parasite

(49–51). The correlation between time of residence in endemic areas and months since the last infection observed in our study also indicates that this phenomenon could be occurring in low/medium endemic areas like the Brazilian Amazon. Therefore, the selection of these individuals was ideal to detect the presence of antibodies against the new recombinant antigen and distinguish whether the alterations found were related to malaria exposure and/or indicatives of protection.

First, we found 94 individuals presenting specific antibodies to PvCelTOS and confirmed the natural immunogenicity of PvCelTOS among exposed individuals from Brazilian Amazon. Recently, Longley and collaborators also reported the first evidence of naturally induced IgG responses to PvCelTOS in human volunteers from Western Thailand (33). Interestingly, the frequency of responders to PvCelTOS observed in our studied population (17.8%) was similar to the frequency observed by Longley on uninfected and clinical malaria individuals (33). Moreover, the low humoral reactivity against PvCelTOS is commonly found in other *Plasmodium* preerythrocytic antigens (48, 52, 53). The short life of specific antibodies, host genetic factors, and/or epidemiological parameters could be possible reasons for the low frequency of responders against PvCelTOS in endemic areas. The short life of specific PvCelTOS humoral response hypothesis does not seem to occur since Longley et al. verified that IgG positivity and magnitude of response were present over the 1-year period in the absence of *P. vivax* infections (33). Our study also describes anti-PvCelTOS antibodies in individuals who reported no malaria in the last 10 years or more. However, in both cases, the contact between human host and sporozoite antigens in transmission areas was not evaluated. In relation to host genetic factors, there is a significant body of

TABLE 2 | Identification of immunogenic regions in PvCelTOS.

Immunogenic region	Sequence	Reactivity index (RI) Mean (CI 95%)	Responders (%)	Position	Peptide sequence	Specific responders (%)	BepiPred score	ESA score
PvCelTOS <sub>N13-V33</sub>	NK <del>NRV</del> <b>SIICAF</b> LALFCFVNV	1.17 (1.07–1.27)	45%	13–27	NK <del>NRV</del> <b>SIICAF</b> LAL	38%	-1.52	0.35
PvCelTOS <sub>E73-K63</sub>	EVIGNELAD <b>NIANEI</b> VSSLOK	0.93 (0.88–0.99)	30%	19–33	<b>SIICAF</b> LALFCFVNV	40%	-2.37	0.07
PvCelTOS <sub>S97-A111</sub>	SFLOS <b>GFDV</b> KTQLKA	0.95 (0.89–1.01)	36%	73–87	EVIGNELAD <b>NIANEI</b>	22%	0.01	0.70
PvCelTOS <sub>P127-V153</sub>	PTEK <b>VASTIK</b> PRVSEDA <b>YFLL</b> GPW	1.39 (1.27–1.50)	69%	79–93	LAD <b>NIANEI</b> VSSLOK	20%	0.14	0.56
				97–111	SFLOS <b>GFDV</b> KTQLKA	36%	0.12	0.91
				127–141	PTEK <b>VASTIK</b> PRV	38%	0.69	0.89
				133–147	IK <b>PRVSEDA</b> YFLLG	92%	0.52	1.14
				139–153	PRVSEDA <b>YFLL</b> GPW	39%	-0.08	0.75
PvCelTOS <sub>L161-5196</sub>	<b>LEEEAEDE</b> FSEDELLD	1.32 (1.21–1.44)	53%	181–195	LEEEAE <b>DE</b> FSEDELLD	43%	0.95	2.15
				182–196	EEEEAE <b>DE</b> FSEDELLD	54%	0.84	2.08

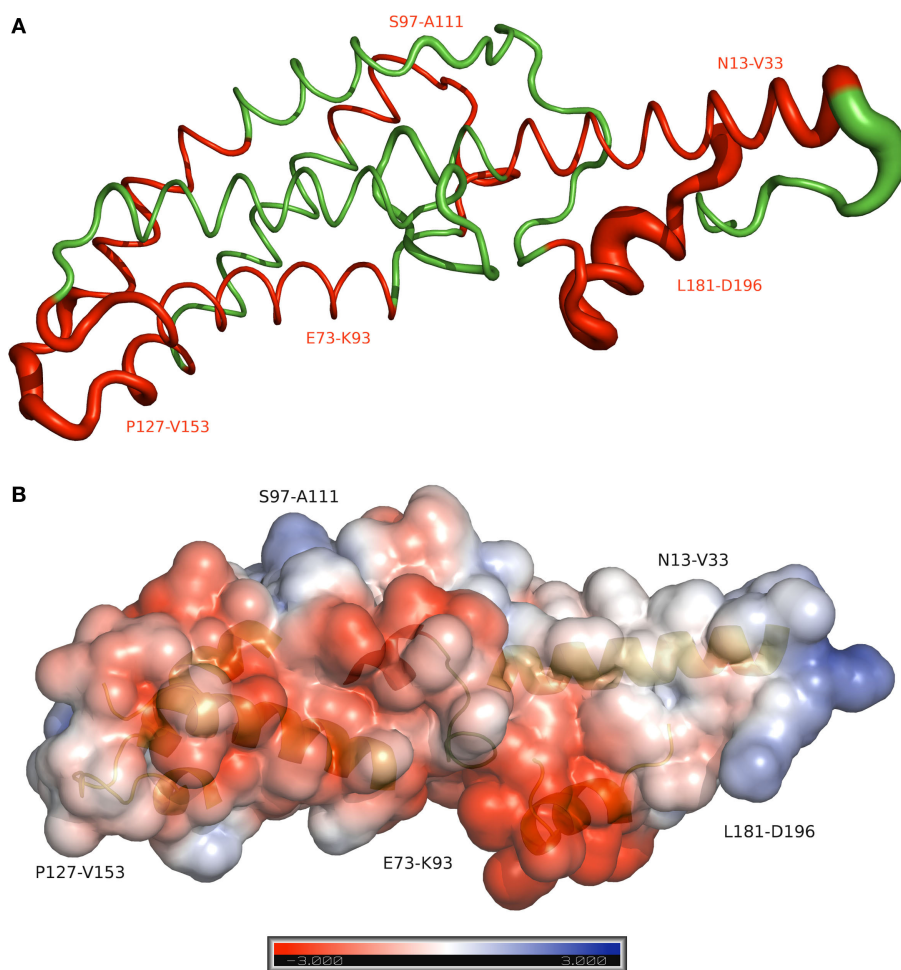
Peptides with overlapping and recognized by more than 20% of responders to PvCelTOS were grouped in immunogenic regions. The RI of an immunogenic region represents the mean of RI of all peptides inserted in that immunogenic region with a confident interval of 95%. The frequency of recognition of immunogenic regions was defined based on the number of individuals with RI to immunogenic region higher than 1. The peptides combined in an immunogenic region were listed with their respective frequencies of recognition, BepiPred score, and Emini surface accessibility (ESA) score. Overlappedmers were signalized by underlined bold typeface on immunogenic region sequence.

evidences of its influence in malaria outcomes and the capacity to mount a humoral immune response (54–57). To date, associations of HLA class II on humoral immune response to malaria antigens were reported in individuals living in malaria-endemic areas from Brazilian Amazon (58, 59) and in human vaccine trials (60–62). In *P. vivax* preerythrocytic targets, the presence of HLA-DRB1\*03 and DR5 was associated with the absence of antibody response to the CSP amino-terminal region (48) and HLA-DRB1\*07 was related to the absence of specific antibodies for CSP repeats of VK210 (52). Moreover, Chaves and collaborators reported that PvCelTOS gene sequence is highly conserved among isolates from different Brazilian geographic regions (unpublished data), suggesting a low selective pressure by immune response against PvCelTOS. In our view, the influence of immunogenetic factors in PvCelTOS-specific humoral response are feasible, but more studies are still necessary to confirm this hypothesis.

Regarding the influence of epidemiological factors, we initially tried to investigate the associations between exposition to malaria and the frequency of IgG responders to PvCelTOS. Surprisingly, although the association of epidemiological data with specific response against *Plasmodium* antigens was well characterized on several studies (63–65), we observed a similar epidemiological profile between responders and NRs to PvCelTOS. Therefore, we focused on the search of distinct epidemiological and IgG subclass profiles among PvCelTOS responder individuals. The knowledge about the antibody subclass profile is critical to suggest functional antimalarial immunity and to evaluate potential vaccine candidates. Cytophilic antibodies (IgG1 and IgG3) are frequently prevalent on immune serum from high-transmission areas (66–69) and often correlate with protection from disease (70–72). In our study, IgG1 presented higher frequencies of responders and median RI than all other subclasses. Moreover, IgG3 RIs were directly associated with the number of malaria episodes over the last 12 months and inversely correlated with the time elapsed from the last malaria episode, suggesting that recent *P. vivax* infections can raise the levels of anti-PvCelTOS specific IgG3. The sterile protective immunity to malaria was recently associated with a panel of antigens (28), and the relationship of cytophilic antibodies and reduced risk of symptoms are a common finding in high endemic areas (70–74). However, in our study, concerning the higher levels of IgG1 for PvCelTOS and the association of IgG3 levels with recent infections, we cannot confirm or discard its role as part of protective humoral response until more conclusive studies, such as sporozoite inhibition by anti-PvCelTOS specific antibodies, are conducted. In the same way, among responders, IgG RIs were directly correlated with the number of previous malaria episodes and inversely correlated with the time elapsed from the last malaria episodes, suggesting that antibody levels for PvCelTOS could be associated with recent infections.

The influence of epidemiological parameters on immunity to malaria was previously observed in studies from Brazilian Amazon population. Based on previous studies that associated high levels of antibodies with multiple preerythrocytic antigens with reduced risk of clinical malaria in children (75) and decreased risk of infection in adults (68), we also aimed to investigate if





**FIGURE 4 | Molecular dynamics and electrostatic potential surface for the PvCelTOS. (A)** Sausage plot of the PvCelTOS. The red color identifies the immunogenic regions of PvCelTOS. Thickness depicts relative fluctuation as calculated during molecular dynamics. The thinnest segments represent the most stable regions of the protein. **(B)** The surface model shows the electrostatic potential surface of the PvCelTOS, representing the positive (blue) and negative (red) charges. The secondary structure in the background represents the immunogenic region.

the epidemiological parameters could reveal new findings about the role of exposition on PvCelTOS immunogenicity. Therefore, we subdivided the large spectrum IgG RIs among PvCelTOS responders into HRs (RI > 2) and LRs (RI < 2). Although LR and NRs to PvCelTOS presented similar exposition factors to malaria, interestingly, HR individuals presented a remarkable higher number of previous malaria episodes, frequency of recent malaria episodes, and a higher ratio of cytophilic/non-cytophilic antibodies than LR. This observation suggested that higher level of exposition to malaria induced a more intense and improved humoral response against PvCelTOS. Unfortunately, the cross-sectional design of our study limited the investigation to retrospective malaria histories, and the best approximation of an individual's protection was the estimated amount of time that had passed since their last malaria episode, which presented no significant association with IgG response against PvCelTOS. Prospective studies on humoral immune responses and studies addressing the ability of these antibodies to interfere the motility/

invasion of sporozoites (76, 77) will provide more evidences of the protective role of anti-PvCelTOS antibodies.

Information at the amino acid level about the epitopes of proteins recognized by antibodies is important for their use as biological tools and for understanding general molecular recognition events (78). In this context, epitope prediction programs have been widely used in malaria research (4, 79–81). Nevertheless, the use of chemically prepared arrays of short peptides is a more powerful tool to identify and characterize epitopes recognized by antibodies (46, 82, 83). It is also important to mention that in order to raise antibodies for a peptide, a minimum length of six amino acids is required, and peptides of >10 amino acids are generally required for the induction of antibodies that may bind to the native protein (84). In this context, the synthesis of 15 amino acid peptides, with 9 overlapping, has allowed the identification of PvCelTOS B-cell epitopes encompassed in sequences ranging from 15 to 27 amino acids in length. Therefore, after the confirmation of PvCelTOS as naturally immunogenic in exposed populations, the present

paper describes for the first time the fine B cell epitope mapping of a full-length protein. Initially, 10 peptides were specifically recognized by naturally acquired antibodies from PvCelTOS responders. After a combination of *in silico* approaches and recognition of overlapped peptides, five immunogenic regions were confirmed (PvCelTOS<sub>13-33</sub>, PvCelTOS<sub>73-93</sub>, PvCelTOS<sub>97-111</sub>, PvCelTOS<sub>127-153</sub>, and PvCelTOS<sub>181-196</sub>) in different frequencies and RIs. Moreover, the main linear epitope (ASTIKPPRVSEDAYF) presented highest IgG RI and frequency compared to all other naturally recognized peptides, suggesting that the majority of naturally acquired antibodies against PvCelTOS are directed to the C-terminal region. Moreover, T cell responses to PvCelTOS may also help to determine the immunodominant repertoire in individuals living in malaria-endemic regions, which could also supply information for the development of a vaccine for PvCelTOS. In humans, PfCelTOS derivate peptides elicited proliferative and IFN- $\gamma$  responses in *ex vivo* ELISPOT assays using peripheral blood mononuclear cells from naturally exposed individuals living in Ghana (30).

Recently, CelTOS was demonstrated as highly conserved protein across several large groups of apicomplexan parasites including *Plasmodium* spp., *Cytauxzoon*, *Theileria*, and *Babesia* and considered essential to cell infection, traversal, and membrane disruption (85). Despite the genetical differences between PfCelTOS and PvCelTOS, it is important to mention that Bergmann-Leitner and colleagues immunized mice and rabbits with recombinant PfCelTOS and also observed specific antibodies for linear B-cell epitopes at C-terminal (82). These observations suggested that CelTOS could present a similar conformation among species, with similar regions targeted by antibodies. We considered that the exposition of linear epitopes is a critical step to their recognition by circulating antibodies; therefore, the combination of ESA, molecular dynamics, and electrostatic potential surface was used as a complementary approach to predict the exposition of epitope sequences on protein surface. All immunogenic regions identified were exposed and accessible to antibodies. This finding could be important in a future subunit vaccine composition based on these identified regions. However, the potential of these specific antibodies directed main PvCelTOS epitopes in the inhibition of sporozoite motility, invasion, and/or traversal remains to be investigated.

## REFERENCES

1. W.H.O. *World Malaria Report*. Geneva: WHO (2015).
2. Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* (2002) 415(6872):694–701. doi:10.1038/415694a
3. W.H.O. *World Malaria Report 2014*. Geneva: WHO (2014).
4. Rodrigues-da-Silva RN, Martins da Silva JH, Singh B, Jiang J, Meyer EV, Santos F, et al. In silico identification and validation of a linear and naturally immunogenic B-cell epitope of the *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidate merozoite surface protein-9. *PLoS One* (2016) 11(1):e0146951. doi:10.1371/journal.pone.0146951
5. WHO. *Tables of Malaria Vaccine Projects Globally ("Rainbow Tables")*. (2015). Available from: [http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow\\_tables/en/](http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/)

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JL-J did study designing, performed experiments, data analysis, manuscript preparation, and manuscript review. RR-d-S did study designing, performed experiments, data analysis, and manuscript preparation. IS performed experiments. CL-C did recombinant protein expression and manuscript review. JM did molecular dynamics and bioinformatics and manuscript review. DP-d-S performed collection of blood and epidemiological data. AF did fieldwork support. AT performed collection of blood and epidemiological data and diagnosis. FP did fieldwork support. LC performed experiments. LP-R did data analysis and manuscript review. AR-S did recombinant protein expression, data analysis, and manuscript review. DB did study designing, fieldwork support, manuscript review, and data analysis.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all volunteers who made this study possible.

## FUNDING

This study was supported by the Brazilian National Research Council – CNPq/PAPES. JL-J is recipient of FAPERJ APQ1 (E-26/210.653/2015), Jovem Cientista do Nosso Estado (E26/203.255/2016), and CPNq-Universal research grants (445150/2014-9). AR-S is supported by a Wellcome Trust Career Development Fellowship 097395/Z/11/Z.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00077/full#supplementary-material>.

### FIGURE S1 | Associations of humoral response and exposition

parameters in responders to PvCelTOS. (A) Spearman correlation between IgG3 reactivity index (RI) and number of recent malaria episodes; (B) Spearman correlation between IgG3 and months elapsed since the last malaria episode; (C) Spearman correlation between anti-PvCelTOS IgG reactivity index and number of previous malaria episodes; and (D) Spearman correlation between anti-PvCelTOS IgG RI and months elapsed since the last malaria episode.

6. Tan LK, Yacoub S, Scott S, Bhagani S, Jacobs M. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infect Dis* (2008) 8(7):449–54. doi:10.1016/S1473-3099(08)70153-1
7. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* (2007) 77(6 Suppl):79–87.
8. Rahimi BA, Thakkinstian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, Chokejindachai W. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malar J* (2014) 13:481. doi:10.1186/1475-2875-13-481
9. O'Brien AT, Ramirez JF, Martinez SP. A descriptive study of 16 severe *Plasmodium vivax* cases from three municipalities of Colombia between 2009 and 2013. *Malar J* (2014) 13:404. doi:10.1186/1475-2875-13-404
10. Gougoutsi A, Karageorgopoulos DE, Dimitriadou A, Melas N, Kranidiotis G, Voutsinas D, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria complicated with acute

- respiratory distress syndrome: a case associated with focal autochthonous transmission in Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2014) 14(5):378–81. doi:10.1089/vbz.2012.1192
11. Zubairi AB, Nizami S, Raza A, Mehraj V, Rasheed AF, Ghanchi NK, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria in Pakistan. *Emerg Infect Dis* (2013) 19(11):1851–4. doi:10.3201/eid1911.130495
  12. Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* (2014) 14(10):982–91. doi:10.1016/S1473-3099(14)70855-2
  13. de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* (2007) 13(7):1125–6. doi:10.3201/eid1307.061386
  14. Ruebush TK II, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg* (2003) 69(5):548–52.
  15. Nayar JK, Baker RH, Knight JW, Sullivan JS, Morris CL, Richardson BB, et al. Studies on a primaquine-tolerant strain of *Plasmodium vivax* from Brazil in Aotus and Saimiri monkeys. *J Parasitol* (1997) 83(4):739–45. doi:10.2307/3284254
  16. Kristensen KL, Dragsted UB. Recurrent *Plasmodium vivax* malaria due to dose-dependent primaquine resistance: a case report. *Scand J Infect Dis* (2014) 46(1):63–5. doi:10.3109/00365548.2013.822093
  17. Arias AE, Corredor A. Low response of Colombian strains of *Plasmodium vivax* to classical antimalarial therapy. *Trop Med Parasitol* (1989) 40(1):21–3.
  18. Swearingen KE, Lindner SE, Shi L, Shears MJ, Harupa A, Hopp CS, et al. Interrogating the *Plasmodium* Sporozoite Surface: Identification of Surface-Exposed Proteins and Demonstration of Glycosylation on CSP and TRAP by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *PLoS Pathog* (2016) 12(4):e1005606. doi:10.1371/journal.ppat.1005606
  19. Clyde DF, McCarthy VC, Miller RM, Hornick RB. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* (1973) 266(6):398–403. doi:10.1097/0000441-197309000-00002
  20. Rieckmann KH, Carson PE, Beaudoin RL, Cassells JS, Sell KW. Letter: sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1974) 68(3):258–9. doi:10.1016/0035-9203(74)90129-1
  21. Egan JE, Hoffman SL, Haynes JD, Sadoff JC, Schneider I, Grau GE, et al. Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* (1993) 49(2):166–73.
  22. Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* (2002) 185(8):1155–64. doi:10.1086/339409
  23. Olotu A, Fegan G, Wambua J, Nyangweso G, Awuondo KO, Leach A, et al. Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *N Engl J Med* (2013) 368(12):1111–20. doi:10.1056/NEJMoa1207564
  24. Rts SCTP, Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, Abossolo BP, Methogo BG, et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* (2012) 367(24):2284–95. doi:10.1056/NEJMoa1208394
  25. Bejon P, Cook J, Bergmann-Leitner E, Olotu A, Lusingu J, Mwacharo J, et al. Effect of the pre-erythrocytic candidate malaria vaccine RTS,S/AS01E on blood stage immunity in young children. *J Infect Dis* (2011) 204(1):9–18. doi:10.1093/infdis/jir222
  26. Olotu A, Lusingu J, Leach A, Lievens M, Vekemans J, Msham S, et al. Efficacy of RTS,S/AS01E malaria vaccine and exploratory analysis on anti-circumsporozoite antibody titres and protection in children aged 5–17 months in Kenya and Tanzania: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* (2011) 11(2):102–9. doi:10.1016/S1473-3099(10)70262-0
  27. Gruner AC, Mauduit M, Tewari R, Romero JF, Depinay N, Kayibanda M, et al. Sterile protection against malaria is independent of immune responses to the circumsporozoite protein. *PLoS One* (2007) 2(12):e1371. doi:10.1371/journal.pone.0001371
  28. Trieu A, Kayala MA, Burk C, Molina DM, Freilich DA, Richie TL, et al. Sterile protective immunity to malaria is associated with a panel of novel *P. falciparum* antigens. *Mol Cell Proteomics* (2011) 10(9):M111007948. doi:10.1074/mcp.M111.007948
  29. Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol Microbiol* (2006) 59(5):1369–79. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05024.x
  30. Anum D, Kusi KA, Ganeshan H, Hollingdale MR, Ofori MF, Koram KA, et al. Measuring naturally acquired ex vivo IFN-gamma responses to *Plasmodium falciparum* cell-traversal protein for ookinets and sporozoites (CelTOS) in Ghanaian adults. *Malar J* (2015) 14:20. doi:10.1186/s12936-014-0539-5
  31. Kusi KA, Bosomprah S, Dodoo D, Kyei-Baafour E, Dickson EK, Mensah D, et al. Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. *Malar J* (2014) 13:103. doi:10.1186/1475-2875-13-103
  32. Bergmann-Leitner ES, Mease RM, De La Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, Ockenhouse C, et al. Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from *Plasmodium falciparum* elicits cross-species protection against heterologous challenge with *Plasmodium berghei*. *PLoS One* (2010) 5(8):e12294. doi:10.1371/journal.pone.0012294
  33. Longley RJ, Reyes-Sandoval A, Montoya-Diaz E, Dunachie S, Kumpitak C, Nguitragool W, et al. Acquisition and longevity of antibodies to *Plasmodium vivax* preerythrocytic antigens in Western Thailand. *Clin Vaccine Immunol* (2016) 23(2):117–24. doi:10.1128/CVI.00501-15
  34. Stanicic DI, Fowkes FJ, Koinari M, Javati S, Lin E, Kiniboro B, et al. Acquisition of antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response. *Infect Immun* (2015) 83(2):646–60. doi:10.1128/IAI.02398-14
  35. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* (2006) 2:2. doi:10.1186/1745-7580-2-2
  36. Emimi EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* (1985) 55(3):836–9.
  37. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun* (1995) 91(1–3):13. doi:10.1016/0010-4655(95)00042-E
  38. Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, van Gunsteren WF. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem* (2004) 25(13):1656–76. doi:10.1002/jcc.20090
  39. William LJ, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* (1983) 79:926–35. doi:10.1063/1.445869
  40. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98(18):10037–41. doi:10.1073/pnas.181342398
  41. Bergmann-Leitner ES, Legler PM, Savranskaya T, Ockenhouse CF, Angov E. Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CelTOS. *Vaccine* (2011) 29(35):5940–9. doi:10.1016/j.vaccine.2011.06.053
  42. Bueno LL, Morais CG, Soares IS, Bouillet LE, Bruna-Romero O, Fontes CJ, et al. *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. *Vaccine* (2009) 27(41):5581–8. doi:10.1016/j.vaccine.2009.07.031
  43. Amarasinghe S, Kathiriarachchi H, Udagama P. Conserved regions of *Plasmodium vivax* potential vaccine candidate antigens in Sri Lanka: consensus in silico analysis of prospective conformational epitope regions. *Asian Pac J Trop Med* (2014) 7(10):832–40. doi:10.1016/S1995-7645(14)60146-2
  44. Xia H, Fang Q, Jangpatrapongsa K, Zhiyong T, Cui L, Li B, et al. A comparative study of natural immune responses against *Plasmodium vivax* C-terminal merozoite surface protein-1 (PvMSP-1) and apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) in two endemic settings. *EXCLI J* (2015) 14:926–34. doi:10.17179/excli2015-388
  45. Lima-Junior JC, Tran TM, Meyer EV, Singh B, De-Simone SG, Santos F, et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. *Vaccine* (2008) 26(51):6645–54. doi:10.1016/j.vaccine.2008.09.029
  46. Lima-Junior JC, Jiang J, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Tran TM, Ribeiro RY, et al. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3alpha



- (PvMSP-3 $\alpha$ ) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. *Vaccine* (2011) 29(9):1801–11. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.099
47. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, Scopel KK, Braga EM, Bastos Mda S, Wunderlich G, et al. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2007) 102(8):943–51. doi:10.1590/S0074-02762007000800009
  48. Storti-Melo LM, da Costa DR, Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Couto VS, Povia MM, et al. Influence of HLA-DRB-1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1, AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*. *Acta Trop* (2012) 121(2):152–5. doi:10.1016/j.actatropica.2011.10.009
  49. Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJ, Morais CG, Martins MS, et al. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg* (2002) 66(5):461–6.
  50. Baird JK. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* (1998) 92(4):367–90. doi:10.1080/00034989859366
  51. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye KS, Druilhe P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect Immun* (2004) 72(1):247–52. doi:10.1128/IAI.72.1.247-252.2004
  52. Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Daniel Ribeiro CT, Goldberg AC, et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop* (2004) 92(1):63–9. doi:10.1016/j.actatropica.2004.02.011
  53. Yildiz Zeyrek F, Palapac N, Yuksel F, Yagi M, Honjo K, Fujita Y, et al. Serologic markers in relation to parasite exposure history help to estimate transmission dynamics of *Plasmodium vivax*. *PLoS One* (2011) 6(11):e28126. doi:10.1371/journal.pone.0028126
  54. Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, Luoni G, Nebie I, Diallo DA, et al. Different response to *Plasmodium falciparum* in west African sympatric ethnic groups: possible implications for malaria control strategies. *Parassitologia* (1999) 41(1–3):193–7.
  55. Modiano D, Chiacchiuini A, Petrarca V, Sirima BS, Luoni G, Roggero MA, et al. Interethnic differences in the humoral response to non-repetitive regions of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Am J Trop Med Hyg* (1999) 61(4):663–7.
  56. Brisebarre A, Kumulungui B, Sawadogo S, Afridi S, Fumoux F, Rihet P. Genome-wide significant linkage to IgG subclass responses against *Plasmodium falciparum* antigens on chromosomes 8p22–p21, 9q34 and 20q13. *Genes Immun* (2015) 16(3):187–92. doi:10.1038/gene.2014.66
  57. Afridi S, Atkinson A, Garnier S, Fumoux F, Rihet P. Malaria resistance genes are associated with the levels of IgG subclasses directed against *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in Burkina Faso. *Malar J* (2012) 11:308. doi:10.1186/1475-2875-11-308
  58. Beck HP, Felger I, Barker M, Bugawan T, Genton B, Alexander N, et al. Evidence of HLA class II association with antibody response against the malaria vaccine SPF66 in a naturally exposed population. *Am J Trop Med Hyg* (1995) 53(3):284–8.
  59. Banic DM, Goldberg AC, Pratt-Riccio LR, De Oliveira-Ferreira J, Santos F, Gras-Masse H, et al. Human leukocyte antigen class II control of the immune response to p126-derived amino terminal peptide from *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* (2002) 66(5):509–15.
  60. Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, Castro ZR, Nussenzweig RS, Schneckpeper B, et al. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. *J Infect Dis* (2000) 182(5):1486–96. doi:10.1086/315871
  61. Murillo LA, Rocha CL, Mora AL, Kalil J, Goldenberg AK, Patarroyo ME. Molecular analysis of HLA DR4 $\beta$  1 gene in malaria vaccinees. Typing and subtyping by PCR technique and oligonucleotides. *Parasite Immunol* (1991) 13(2):201–10. doi:10.1111/j.1365-3024.1991.tb00275.x
  62. Stephens HA, Brown AE, Chandanayingyong D, Webster HK, Sirikong M, Longta P, et al. The presence of the HLA class II allele DPB1\*0501 in ethnic Thais correlates with an enhanced vaccine-induced antibody response to a malaria sporozoite antigen. *Eur J Immunol* (1995) 25(11):3142–7. doi:10.1002/eji.1830251123
  63. Maitland K, Williams TN, Bennett S, Newbold CI, Peto TE, Viji J, et al. The interaction between *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in children on Espiritu Santo island, Vanuatu. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1996) 90(6):614–20. doi:10.1016/S0035-9203(96)90406-X
  64. Luxemburger C, Thwai KL, White NJ, Webster HK, Kyle DE, Maelankirri L, et al. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1996) 90(2):105–11. doi:10.1016/S0035-9203(96)90102-9
  65. Kaneko A, Chaves LF, Taleo G, Kalkoa M, Iozumi R, Wickremasinghe R, et al. Characteristic age distribution of *Plasmodium vivax* infections after malaria elimination on Aneityum Island, Vanuatu. *Infect Immun* (2014) 82(1):243–52. doi:10.1128/IAI.00931-13
  66. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun* (1992) 60(4):1473–81.
  67. Chelimo K, Ofulla AV, Narum DL, Kazura JW, Lanar DE, John CC. Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens vary by age and antigen in children in a malaria-holoendemic area of Kenya. *Pediatr Infect Dis J* (2005) 24(8):680–4. doi:10.1097/01.inf.0000172151.28851.f1
  68. John CC, Moormann AM, Pregon DC, Sumba PO, McHugh MM, Narum DL, et al. Correlation of high levels of antibodies to multiple pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and protection from infection. *Am J Trop Med Hyg* (2005) 73(1):222–8.
  69. Stanicic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun* (2009) 77(3):1165–74. doi:10.1128/IAI.01129-08
  70. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, et al. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg* (1996) 54(5):449–57.
  71. Metzger WG, Okenu DM, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol* (2003) 25(6):307–12. doi:10.1046/j.1365-3024.2003.00636.x
  72. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, et al. Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect Immun* (2008) 76(2):759–66. doi:10.1128/IAI.01147-07
  73. Shi YP, Sayed U, Qari SH, Roberts JM, Udhayakumar V, Oloo AJ, et al. Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infect Immun* (1996) 64(7):2716–23.
  74. Roussilhon C, Ouevray C, Muller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape JF, et al. Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Med* (2007) 4(11):e320. doi:10.1371/journal.pmed.0040320
  75. John CC, Tande AJ, Moormann AM, Sumba PO, Lanar DE, Min XM, et al. Antibodies to pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children. *J Infect Dis* (2008) 197(4):519–26. doi:10.1086/526787
  76. Mishra S, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Antibodies to *Plasmodium* circumsporozoite protein (CSP) inhibit sporozoite's cell traversal activity. *J Immunol Methods* (2012) 377(1–2):47–52. doi:10.1016/j.jim.2012.01.009
  77. Stewart MJ, Nawrot RJ, Schulman S, Vanderberg JP. *Plasmodium berghei* sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. *Infect Immun* (1986) 51(3):859–64.
  78. Reineke U, Sabat R. Antibody epitope mapping using SPOT peptide arrays. *Methods Mol Biol* (2009) 524:145–67. doi:10.1007/978-1-59745-450-6\_11
  79. Lima-Junior JC, Banic DM, Tran TM, Meyer VS, De-Simone SG, Santos F, et al. Promiscuous T-cell epitopes of *Plasmodium* merozoite surface protein 9 (PvMSP9) induces IFN-gamma and IL-4 responses in individuals naturally exposed to malaria in the Brazilian Amazon. *Vaccine* (2010) 28(18):3185–91. doi:10.1016/j.vaccine.2010.02.046



80. Lin HH, Zhang GL, Tongchusak S, Reinherz EL, Brusic V. Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics* (2008) 9(Suppl 12):S22. doi:10.1186/1471-2105-9-S12-S22
81. Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourao LC, de Avila RA, Soares IS, et al. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One* (2011) 6(6):e21289. doi:10.1371/journal.pone.0021289
82. Bergmann-Leitner ES, Chaudhury S, Steers NJ, Sabato M, Delvecchio V, Wallqvist AS, et al. Computational and experimental validation of B and T-cell epitopes of the in vivo immune response to a novel malarial antigen. *PLoS One* (2013) 8(8):e71610. doi:10.1371/journal.pone.0071610
83. Lin M, McRae H, Dan H, Tangorra E, Laverdiere A, Pasick J. High-resolution epitope mapping for monoclonal antibodies to the structural protein Erns of classical swine fever virus using peptide array and random peptide phage display approaches. *J Gen Virol* (2010) 91(Pt 12):2928–40. doi:10.1099/vir.0.023259-0
84. Dyrberg T, Oldstone MB. Peptides as antigens. Importance of orientation. *J Exp Med* (1986) 164(4):1344–9. doi:10.1084/jem.164.4.1344
85. Jimah JR, Salinas ND, Sala-Rabanal M, Jones NG, Sibley LD, Nichols CG, et al. Malaria parasite CelTOS targets the inner leaflet of cell membranes for pore-dependent disruption. *Elife* (2016) 5:e20621. doi:10.7554/eLife.20621

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

Copyright © 2017 Rodrigues-da-Silva, Soares, Lopez-Camacho, Martins da Silva, Perce-da-Silva, Têva, Ramos Franco, Pinheiro, Chaves, Pratt-Riccio, Reyes-Sandoval, Banic and Lima-Junior. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.