

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

**Plataforma sorológica pela citometria de fluxo para detecção de anticorpos
contra antígenos sanguíneos de *Plasmodium vivax***

por

Jéssica Rafaela dos Santos Alves

Belo Horizonte

2021

TESE-D/CS - IRR

J.R.S. ALVES

2021

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

**Plataforma sorológica pela citometria de fluxo para detecção de anticorpos
contra antígenos sanguíneos de *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Coorientação: Dra. Andréa Teixeira-Carvalho

Dra. Fernanda Fortes de Araújo

Belo Horizonte

2021

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

S596p
2021

Alves, Jéssica Rafaela dos Santos

Plataforma sorológica pela citometria de fluxo para detecção de anticorpos contra antígenos sanguíneos de *Plasmodium vivax* / Jéssica Rafaela dos Santos Alves – Belo Horizonte, 2021.

XIV, 117 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 92-107

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

1. Plasmodium vivax 2. Proteína de ligação 3 Citometria de Fluxo I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena e de Carvalho, Andréa Teixeira (Orientação). III. Araújo, Fernanda Fortes (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

Jéssica Rafaela dos Santos Alves

**Plataforma sorológica pela citometria de fluxo para detecção de anticorpos
contra antígenos sanguíneos de *Plasmodium vivax***

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

Banca examinadora:

Dra. Luzia Helena Carvalho-IRR/Fiocruz Minas (Orientadora/presidente)

Dra. Andréa Teixeira-Carvalho-IRR/Fiocruz Minas (Orientadora)

Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel – UFJF (Titular)

Dr. Henrique Gama Ker – IEC (Titular)

Dra. Irene da Silva Soares – USP (Titular)

Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau - UFMG (Titular)

Dr. Armando de Menezes Neto – IAM/Fiocruz (Suplente)

Tese defendida e aprovada dia 15 de outubro de 2021

*Aos meus avós Lázaro Mascena e Maria
das Graças Santos*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força, sabedoria, e fortalecer a minha fé nos momentos difíceis que encontrei durante a caminhada até aqui.

Aos meus pais e toda a minha família pelo apoio, e por compartilharem comigo os momentos de alegria! Em especial meus avós Lázaro e Maria, a quem eu dediquei este trabalho. Muito obrigada por serem meus maiores incentivadores.

Aos companheiros de jornada que a ciência me deu, Barbara, Letícia, Daniela, Michele, Camilla e Daniel por me ajudar, apoiar e incentivar dentro e fora do laboratório.

A todos que fizeram parte do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM) durante esses dez anos.

À Dra. Flávia Alessandra, por ter sido a primeira a confiar em mim, me dar a oportunidade de fazer parte do grupo e me ensinar a trabalhar com amor.

À Dra. Luzia, pela oportunidade e confiança. Muito obrigada por contribuir com dedicação para o meu crescimento profissional, acadêmico e científico.

À Dra. Andréa Teixeira-Carvalho e Dra. Fernanda Fortes por terem aceitado fazer parte desse projeto, e contribuírem sempre com excelência, disposição e entusiasmo.

À Dra. Flora Kano pelo suporte e disponibilidade.

Aos moradores do assentamento agrícola de Rio Pardo por me receberem com tanto carinho durante as minhas experiências com trabalhos de campo.

À todos professores do curso, pelos ensinamentos.

À plataforma de Citometria de Fluxo, pelo fornecimento da infraestrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ao Instituto René Rachou (FIOCRUZ) pelo apoio estrutural e financeiro.

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

RESUMO

A malária causada pelo *P. vivax* atinge milhões de pessoas no mundo sendo responsável por grande parte da morbidade da malária humana. Considerando que as medidas de controle atualmente disponíveis apresentam limitações, faz-se necessário intensificar esforços para o desenvolvimento de metodologias alternativas que possam efetivamente contribuir para o controle e eliminação da doença em longo-prazo. Para isso, torna-se necessário avaliar a resposta imune contra os principais antígenos candidatos à vacina, e marcadores de exposição, considerando o novo perfil epidemiológico de transmissão reduzida da malária no Brasil e no mundo. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi de desenvolver plataformas sorológicas pela citometria de fluxo para avaliar anticorpos contra as formas sanguíneas do *P. vivax* que possam ser indicativos de imunidade adquirida (Parte I) ou de infecção aguda ou recente (Parte II). Para identificar anticorpos relacionados a imunidade adquirida, o presente trabalho concentrou-se na resposta de anticorpos que bloqueiam a principal via utilizada pelo *P. vivax* na invasão dos reticulócitos, mediada pela região II da Duffy binding protein (DBPII) e seu receptor DARC presente na superfície dos eritrócitos. Apesar dos anticorpos capazes de bloquear a interação DBPII-DARC (*binding inhibitory antibodies*, BIABs) estarem associados a proteção clínica, poucos estudos têm investigado estes anticorpos funcionais. Parte da dificuldade se deve a complexidade dos ensaios funcionais que avaliam a interação DBPII-DARC. Baseado na hipótese de que uma resposta de anticorpos anti-DBPII contra diferentes variantes alélicas da proteína poderia ser indicativa de BIABs, padronizou-se um ensaio multiplex para a detecção da resposta de anticorpos contra diferentes construções de DBPII, incluindo epítomos conservados (DEKnull-2) e polimórficos de variantes nativas prevalentes na Amazônia (Sal-1 e Brz-1). O desenho do estudo incluiu 245 amostras plasmáticas de indivíduos com histórico de longa exposição à malária na Amazônia. As amostras foram caracterizadas pela presença de BIABs através do ensaio funcional de referência que utiliza células COS-7 expressando a DBPII (padrão-ouro). Os resultados mostraram que a plataforma de citometria aqui desenvolvida permitiu, com elevada acurácia, identificar indivíduos com anticorpos BIABs. De relevância, o ensaio poderá ser adaptado para outras áreas endêmicas, sendo necessário a inclusão de variantes alélicas prevalentes na área a ser estudada. Em uma segunda parte do projeto, buscou-se identificar anticorpos associados a presença de infecção aguda ou recente por *P. vivax*. A hipótese do trabalho foi a de que a resposta de anticorpos contra antígenos sanguíneos altamente imunogênicos seria indicativa de infecção aguda, e/ou exposição recente ao *P. vivax*, particularmente, para indivíduos sem história de exposição prévia à malária. Para tal, padronizou-se um ensaio sorológico pela citometria de fluxo para determinar a resposta de anticorpos contra uma proteína quimérica composta pelos antígenos AMA-1 e MSP1-19 (AMA1/MSP1-19). A população de estudo foi constituída de indivíduos primoinfectados pelo *P. vivax*, residentes em Minas Gerais (área não endêmica) ou na Amazônia (RO e AM). Em conjunto, os resultados da resposta de anticorpos IgM e IgG mostraram que a proteína quimérica foi altamente imunogênica nas populações de estudo (frequência de resposta variando de 57-76% para IgM e 78% para IgG). No ensaio de multiplex, a acurácia da proteína quimérica foi superior as proteínas individuais, com especificidade de 90-95% e sensibilidade 60-64%. De interesse, nas amostras dos indivíduos residentes fora da área de transmissão, ensaios de cinética demonstram que anticorpos IgG (mas não IgM) permitiram identificar um “*booster*” na resposta em indivíduos que apresentaram episódios de recaídas. Em resumo, os resultados

demonstram o potencial da plataforma multiplex na avaliação da resposta de anticorpos em primoinfecção pelo *P. vivax*. Ensaios futuros fazem-se necessários para aumentar a sensibilidade do ensaio visando o potencial uso em bancos de sangue localizado fora da área endêmica e/ou para identificar indivíduos com infecção aguda ou recente em surtos de transmissão por *P. vivax*.

Palavras chave: 1) *Plasmodium vivax*, 2) Duffy binding protein, 3) AMA-1, 4) MSP1-19, 5) Flow cytometry serological assay

ABSTRACT

Malaria remains a major public health problem worldwide, and *Plasmodium vivax* is the most widely distributed malaria parasite. Malaria control measures currently available have limitations, which make relevant alternative strategies to facilitate control and malaria elimination. Considering the new epidemiological profile of reduced malaria transmission worldwide, it seems to be critical to evaluate *P. vivax* antigens that can be used as serological marker of clinical protection or malaria transmission. The objective of the present work was to develop flow cytometry serological platforms to evaluate antibodies against blood forms of *P. vivax* associated with acquired immunity (Part I) or acute/recent infection (Part II). Naturally acquired binding inhibitory antibodies (BIAbs) to region II of the Duffy binding protein (DBP-II), a *P. vivax* ligand that is critical for reticulocyte invasion, are associated with a reduced risk of clinical malaria. Owing to methodological issues in evaluating antibodies that inhibit the DBP-II–DARC interaction, a limited number of studies have investigated DBP-II BIAbs in *P. vivax*-exposed populations. Based on the assumption that individuals with a consistent BIAb response are characterized by strain-transcending immune responses, we hypothesized that detecting broadly reactive DBP-II antibodies would indicate the presence of BIAb response. By taking advantage of an engineered DBP-II immunogen targeting conserved DBP-II neutralizing epitopes (DEKnull-2), we standardized a multiplex flow cytometry-based serological assay to detect broadly neutralizing IgG antibodies. For this study, a standard in vitro cytoadherence assay with COS-7 cells expressing DBP-II was used to test for DBP-II BIAb response in long-term *P. vivax*-exposed Amazonian individuals. Taken together, the results demonstrate that this DBP-II-based multiplex assay facilitates identifying DBP-II BIAb carriers. Of relevance, the ability of the multiplex assay to identify BIAb responders was highly accurate when the positivity for all antigens was considered. In conclusion, the standardized DBP-II-based flow cytometric assay confirmed that DBP-II-BIAb activity was associated with the breadth rather than the magnitude of anti-DBP-II antibodies. Altogether, our results suggest that multiplex detection of broadly DBP-II-reactive antibodies facilitates preliminary screening of BIAb responders. Based on the hypothesis that the antibody response against highly immunogenic blood antigens would be indicative of acute infection, and/or recent exposure to *P. vivax*, particularly for individuals with no history of previous exposure to malaria. In a second part of the project, we sought to identify antibodies associated with the presence of acute or recent *P. vivax* infection. To this, a serological assay was standardized by flow cytometry to determine the antibody response against a chimeric protein that includes the antigens AMA-1 and MSP1-19 (AMA1/MSP1-19). Samples of individuals primarily infected with *P. vivax*, residing in Minas Gerais (non-endemic area) or in the Amazon region (RO and AM) were evaluated. Taken together, the results of the IgM and IgG antibody response showed that the chimeric protein was highly immunogenic in the study populations (response ranging from 57-76% for IgM and 78% for IgG). In the multiplex assay, the accuracy of the chimeric protein was superior to individual proteins, with a specificity of 90-95% and sensitivity of 60-64%. Of interest, in samples from individuals residing in a non-endemic area, the IgG (but not IgM) antibodies allowed the identification of a “booster” in the response in individuals who had relapsed episodes. In summary, the results demonstrate the potential of the multiplex platform in the evaluation of antibody response in *P. vivax* prime infected individuals. Future assays are needed to increase the sensitivity of the assay for potential use in blood banks located outside the endemic area and/or to identify individuals with acute or recent infection in outbreaks of *P. vivax* transmission.

Keywords: 1) *Plasmodium vivax*, 2) Duffy binding protein, 3) AMA-1, 4) MSP1-19, 5) Flow cytometry serological assay

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de casos de malária por país com transmissão (casos por 1000 habitantes vivendo em áreas de risco), em 2018.....	17
Figura 2. Número de casos de malária notificados de 1959-2020.....	18
Figura 3. Número de casos de malária e letalidade registrados no Brasil de 2010-2018.....	20
Figura 4. Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i> no hospedeiro humano e no vetor <i>Anopheles</i>	21
Figura 5. Representação esquemática do processo de invasão dos eritrócitos pelos parasitos da malária.....	25
Figura 6. Representação esquemática dos domínios estruturais da <i>Duffy binding protein</i> de <i>P. vivax</i>	28
Figura 7. Representação esquemática dos protótipos vacinais da família DEKnull.....	31
Figura 8. Representação esquemática do processo de montagem e processamento do complexo MSP1.....	32
Figura 9. Representação esquemática da interação entre AMA-1 (verde) e o complexo RON (azul).....	35
Figura 10. Fluxograma referente ao desenho experimental do estudo que visa identificar anticorpos contra as formas sanguíneas do <i>P. vivax</i> , sejam bloqueadores da interação ligante-receptor (Parte I) ou indicativos de infecção aguda e/ou exposição recente (Parte II).....	41
Figura 11. Mapa do estado do Amazonas, região noroeste do Brasil, mostrando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo, dentro da municipalidade de Presidente Figueiredo (representado em cinza), localizado a aproximadamente 160Km de Manaus.....	43
Figura 12. Representação esquemático do ensaio funcional com células COS-7.....	50
Figura 13. Representação esquemática do processo de acoplamento dos antígenos recombinantes às microesferas.....	51
Figura 14. Estratégia de análise para determinação da intensidade média de fluorescência no programa FlowJo.....	53
Figura 15. Experimentos de titulação realizados para padronização dos ensaios de citometria para os antígenos DEKnull-2, DBPII Sal-1 e DBPII Brz-1	57
Figura 16. Reconhecimento de epítomos específicos de DBPII (inibitórios e não-inibitórios) por anticorpos monoclonais (MAb).....	58
Figura 17. Intensidade da resposta de anticorpos no ensaio sorológico multiplex para os antígenos DEKnull-2, DBPII Sal-1 e DBPII Brz-1	61
Figura 18. Avaliação da performance da plataforma sorológica pela citometria de fluxo.....	62
Figura 19. Diagrama de Venn das amostras positivas no ensaio sorológico multiplex pela citometria de fluxo e pelo ensaio funcional com células COS-7 expressando a DBPII.....	63

Figura 20. Associação entre a resposta de anticorpos no ensaio multiplex pela citometria de fluxo e a presença de anticorpos inibitórios (BIAbs) em indivíduos naturalmente expostos.....	64
Figura 21. Frequência de indivíduos com primoinfecção pelo <i>P. vivax</i> que responderam pela sorologia convencional de ELISA a proteína quimérica AMA1/MSP1-19, e seus respectivos antígenos individuais, MSP1-19 e AMA-1	67
Figura 22. Experimentos de titulação realizados para padronização do ensaio sorológico de citometria de fluxo para determinar a resposta de anticorpos IgM específico para as proteínas quimérica e não quiméricas de <i>Plasmodium vivax</i>	69
Figura 23. Experimentos de titulação realizados para padronização do ensaio sorológico pela citometria de fluxo para determinar a resposta de anticorpos IgG contra as proteínas quimérica e não quiméricas de <i>Plasmodium vivax</i>	70
Figura 24. Intensidade da resposta de anticorpos IgM e IgG detectado no ensaio sorológico pela citometria contra os diferentes antígenos sanguíneos de <i>P. vivax</i>	73
Figura 25. Ausência de correlação entre as respostas de anticorpos IgM e IgG pela citometria de fluxo para os antígenos AMA-1 (A), MSP1-19 (B) e proteína quimérica AMA1/MSP1-19 (C).....	74
Figura 26. Análises de performance do ensaio sorológico multiplex na determinação da resposta de anticorpos IgM e IgG contra antígenos sanguíneos de <i>P. vivax</i>	75
Figura 27. Intensidade da resposta de anticorpos IgM e IgG contra proteína quimérica de <i>P. vivax</i> em função da parasitemia e tempo com sintomas clínicos.....	77
Figura 28. Cinética da resposta de anticorpos IgM e IgG contra a proteína quimérica de <i>P. vivax</i> AMA1/MSP1-19 em amostras de indivíduos primoinfectados residentes em área não-endêmica de malária.....	79
Figura 29. Cinética da resposta de anticorpos IgM e IgG contra a proteína quimérica em amostras de indivíduos primoinfectados residente em áreas endêmicas de malária (n=24).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e hematológicas dos 70 indivíduos agudos primoinfectados residentes em área endêmica de malária envolvidos no estudo.....	45
Tabela 2. Avaliação da resposta de anticorpos anti-DBPII pela citometria de fluxo em ensaio realizado no formato simplex e multiplex.....	60
Tabela 3. Indicadores de performance do ensaio sorológico pela citometria de fluxo.....	76
Tabela 4. Intensidade da resposta (MFI) de anticorpos IgM e IgG contra a proteína quimérica em amostras de cinética de indivíduos primoinfectados admitidos em Manaus e Porto Velho.....	81

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Panorama da Malária no mundo	15
1.2 Malária no Brasil.....	17
1.3 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrado	21
1.3.1 Processo de invasão dos reticulócitos pelo <i>P. vivax</i>	24
1.4 Resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea do <i>P. vivax</i>	26
1.4.1 Duffy Binding Protein (DBP): principal antígeno candidato à vacina contra as formas sanguíneas do <i>P. vivax</i>	27
1.4.2 Protótipo vacinal baseado na DBP-II: DEKnull-2.....	29
1.4.3 Proteína de Superfície do Merozoíto-1 (MSP-1).....	31
1.4.4 Antígeno Apical de Membrana-1 (AMA-1).....	34
1.5 Citometria de fluxo como potencial para avaliação da resposta de anticorpos a antígenos de formas sanguíneas de <i>P. vivax</i>	36
2. Justificativa.....	37
3. Objetivos	39
3.1 Objetivos específicos:.....	39
4. Desenho metodológico e abordagem experimental	40
4.1 Áreas de estudo e voluntários	42
4.1.1 Indivíduos com histórico de longa exposição à malária vivax: Comunidade de Rio Pardo	42
4.1.2 Indivíduos primoinfectados de área não-endêmica de malária: Sousa- Minas Gerais.....	43
4.1.3 Indivíduos primoinfectados de área endêmica de malária: Manaus e Porto Velho	44
4.1.4 Painel de amostras controle de indivíduos nunca expostos à malária: Belo Horizonte – Minas Gerais.....	46
4.2 Antígenos recombinantes.....	46

4.2.1 Proteína de ligação ao antígeno Duffy, região II (Duffy binding protein II, DBPII).....	46
4.2.2 Antígeno sintético: DEKnull-2.....	47
4.2.3 Proteína quimérica baseada na Proteína de Superfície do Merozoíto 1-19 (MSP1-19) e no Antígeno Apical de membrana 1 (AMA-1).....	47
4.3 Ensaio imuno-enzimático (ELISA).....	47
4.4 Transfecção de células COS-7 e ensaio funcional.....	48
4.5 Ensaio com microesferas pela citometria de fluxo: <i>Multiplexed-microsphere-based flow cytometry assay</i>	50
4.5.1 Preparação das microesferas e acoplamento dos antígenos.....	51
4.5.2 Ensaio sorológico multiplex.....	51
4.6 Análise estatística.....	54
5. Resultados	54
5.1 Acoplamento das proteínas de <i>P. vivax</i> às microesferas e padronização dos ensaios de multiplex pela citometria de fluxo.	55
5.2 Avaliação da resposta de anticorpos anti-DBPII em amostras de indivíduos naturalmente expostos aos <i>P. vivax</i>	58
5.3 Amplitude da resposta de anticorpos detectados pela citometria de fluxo e a presença de anticorpos inibitórios (BIAbs).	62
5.4 Resposta de anticorpos contra proteínas quimérica e não quiméricas de AMA1 e MSP1-19 pela sorologia convencional de ELISA em amostras de indivíduos primoinfectados com o <i>P. vivax</i>	65
5.5 Acoplamento das proteínas quimérica e não quiméricas de <i>P. vivax</i> às microesferas e padronização do ensaio de citometria de fluxo	68
5.6 Performance da proteína quimérica AMA-1/MSP1-19 e das proteínas não quiméricas na citometria de fluxo para identificar indivíduos primoinfectados com o <i>P. vivax</i>	71
5.7 Positividade do ensaio de citometria de fluxo em função da parasitemia e do tempo de sintomas clínicos dos pacientes primoinfectados com <i>P. vivax</i>	76

5.8 Cinética da resposta de anticorpos contra a proteína quimérica AMA1/MSP1-19 no ensaio de citometria de fluxo na primoinfecção pelo <i>P. vivax</i>	78
6. Discussão.....	82
7. Conclusões.....	91
Referências bibliográficas	93
Apêndice 1: Artigo	108

1. Introdução

1.1 Panorama da Malária no mundo

A malária é uma doença infecciosa e parasitária causada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Atualmente, cinco espécies são responsáveis pelos casos de malária humana, - *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e o *P. knowlesi*, sendo este último parasito de primatas não-humanos, que recentemente têm causado infecções graves em humanos, principalmente no sudeste asiático e no continente africano (COX-SINGH et al., 2008; COX-SINGH; SINGH; KRISHNA, 2010; ONG et al., 2009).

Entre as espécies causadoras de malária em humanos, o *P. falciparum* ainda é responsável pela maioria dos casos e mortes, principalmente na região da África, onde foi responsável por 97% dos casos em 2019 (WHO, 2020). Já, o *P. vivax*, por sua vez, é a espécie que possui a maior distribuição geográfica mundial, além de ser a espécie mais prevalente fora do continente africano (BATTLE et al., 2019).

De acordo com os últimos dados epidemiológicos, 229 milhões de casos ocorreram em 2019 e 409 mil mortes foram registradas em todo mundo. Aproximadamente 85% das mortes ocorreram nas regiões da África e Índia, sendo o grupo mais vulnerável crianças menores que 5 anos, que representaram quase 70% dos casos fatais (WHO, 2020).

Entre 2010 e 2018, a incidência global de malária caiu significativamente, com taxas que passaram de 71 para 57 casos por 1000 habitantes vivendo em áreas de risco. A África e o Sudeste asiático (Figura 1), apesar de constituírem as regiões do mundo com o maior número de casos de malária, foram também as regiões que apresentaram as maiores reduções na incidência da doença nos últimos anos. Mais especificamente, a África registrou uma queda de 22%, e o Sudeste Asiático uma queda de 71% nas taxas de incidência (WHO, 2019).

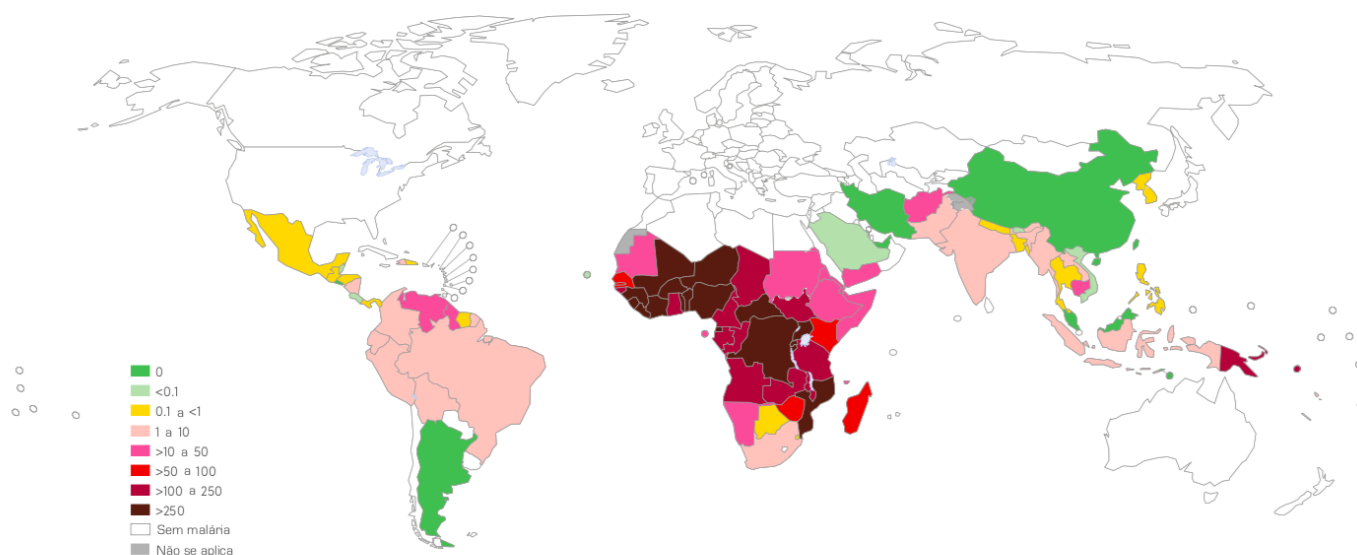
Apesar disto, entre 2015-2019 observou-se uma estabilidade no número de casos. Esse fato é atribuído ao aumento do número de casos em algumas regiões, como o Mediterrâneo oriental e as Américas. Na região do Mediterrâneo apenas o Sudão foi responsável por 40% dos mais de 5 milhões de casos registrados em 2018 (WHO, 2019). Com relação a região das Américas, a República Bolivariana da

Venezuela enfrentou uma grave crise sócio-humanitária, política e econômica. Tal fato, refletiu diretamente no total de casos de malária registrados na região, fazendo com que o país fosse responsável por 50% do total de casos registrados na América Latina (WHO, 2019). Como consequência do colapso dos programas de saúde pública, entre 2010 e 2017, a incidência de malária na Venezuela registrou um aumento de 356%.

Estima-se que a pandemia atual causada pelo vírus Sars-Cov-2 (Covid-19) pode impactar os programas de controle de malária, particularmente, na região da África Subsaariana, onde a malária é altamente prevalente (TEBOH-EWUNGKEM; NGWA, 2021). Nesta região, o impacto da pandemia de covid-19 poderá resultar em redução significativa na distribuição dos mosquiteiros impregnados com inseticidas (ITNs) bem como no acesso dos pacientes ao diagnóstico/tratamento antimalárico. Neste cenário, as estimativas são de um aumento de até 20% no número de casos e de até 65% no número de mortes na região (WEISS et al., 2021; WHO, 2020). Estes dados resultariam, em grande parte, da sobrecarga de um sistema de saúde historicamente deficiente e dos impactos econômicos-sociais das medidas restritivas de mobilidade da população (HUSSEIN et al., 2020; WEISS et al., 2021), WHO, 2020.) Assim, para se evitar um retrocesso dos programas de controle na malária, faz-se necessário que as medidas de combate a pandemia de COVID-19 não sejam dissociadas daquelas de controle da malária (WEISS et al., 2021).

Muitos são os desafios para controlar e eliminar a transmissão de malária no mundo. Neste sentido, foi implementada em 2015 pela Assembleia Mundial da Saúde (*World Health Assembly*), liderada pela OMS, a Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030 (*Global Technical Strategy for Malaria – GTS*) (WHO, 2015). Dentre os principais objetivos do programa até o ano de 2030, destacam-se: (i) redução de pelo menos 90% na taxa de mortalidade global e na incidência de casos de malária, em comparação aos dados de 2015; (ii) eliminação da doença em pelo menos 35 países com transmissão ativa de malária; e (iii) prevenção do restabelecimento da malária em todos os países já certificados como livres de transmissão.

Figura 1. Incidência de casos de malária por país com transmissão (casos por 1000 habitantes vivendo em áreas de risco), em 2018.



No mapa as cores representam as diferenças na incidência. (Adaptado de WHO 2019).

1.2 Malária no Brasil

Apesar do aumento no número de casos nos anos de 2017 e 2018, em 2020 foram notificados no Brasil aproximadamente 140 mil casos de malária, que corresponde a uma redução de 10,5% em relação ao ano de 2019, e de 27,5% em relação ao ano de 2018 (Figura 2) (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021).

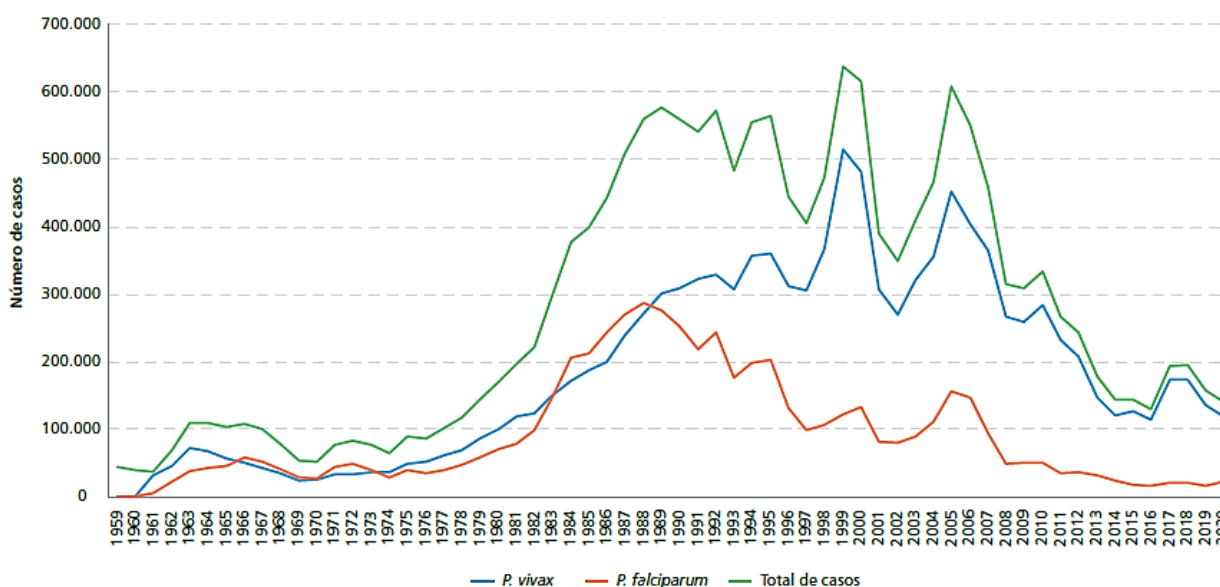
Três espécies de *Plasmodium* são responsáveis pela maioria dos casos de malária humana no Brasil, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo o *P. vivax* a espécie mais prevalente, responsável por aproximadamente 90% dos casos (WHO, 2019).

Ressalta-se que o *P. vivax* possui aspectos importantes relacionados à sua biologia que representam um grande desafio para os programas de controle e eliminação da transmissão (FERREIRA; CASTRO, 2016; MUELLER et al., 2009; TAUIL, 2011) , incluindo: i) formação de hipnozoítos, que são formas latentes no fígado, responsáveis pelas recaídas da doença (VAISHNAVI; THULASIRAM, 2015;

WHITE, 2019); ii) formação precoce de gametócitos, formas infectantes para os mosquitos vetores, (DOUGLAS et al., 2013); iii) invasão preferencial de reticulócitos (KANJEE et al., 2018a; MALLERET et al., 2015; NTUMNGIA et al., 2016), presentes na circulação em baixa frequência, resultando em parasitemias não detectadas pelos métodos de diagnóstico convencionais. Assim, os métodos tradicionais de controle, baseados em diagnóstico precoce e tratamento oportuno, tem pouco impacto no controle desta espécie (DA SILVA-NUNES et al., 2012; FERREIRA; CASTRO, 2016, 2019).

De fato, o tratamento precoce, antes que os gametócitos apareçam na circulação, demonstrou considerável impacto na transmissão de *P. falciparum*. Já o tratamento precoce contra *P. vivax* não apresentou muita eficácia, uma vez que os gametócitos se mantêm circulantes no sangue cerca de três dias após o início do ciclo eritrocítico (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Além disso, as infecções decorrentes da presença de *P. vivax* transcorrem, na maioria das vezes, em infecções preferencialmente benignas e muitas vezes assintomáticas, favorecendo a subnotificação desta espécie (FERREIRA; CASTRO, 2016).

Figura 2. Número de casos de malária notificados de 1959-2020.



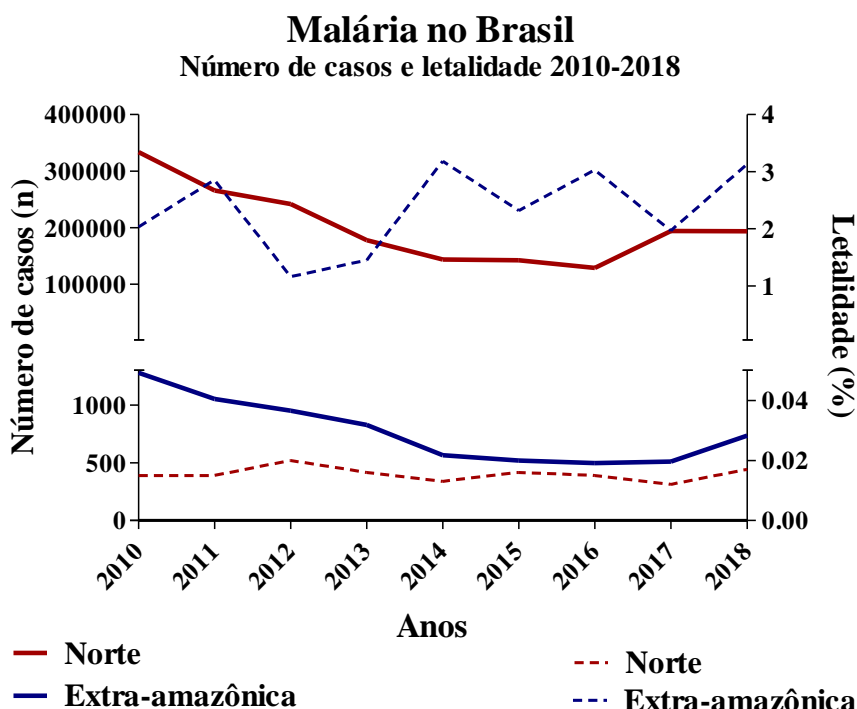
Fonte: SHM, Sismal, Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Data de atualização: Sivep-Malária em 30 de março de 2021 e Sinan em 26 de março de 2021. Excluídos

resultados negativos, nulos e as lâminas de verificação de cura (LVC). (Adaptado de SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021).

A região da Amazônia Legal é responsável por quase a totalidade de casos. Nessa região, as condições socioeconômicas, sociais e ambientais, contribuem historicamente para a manutenção da transmissão da malária. A ocupação intensa e desordenada da população de baixa renda na periferia das grandes cidades, associadas ao desmatamento, favorecem a criação de criadouros do mosquito vetor (CRUZ MARQUES, 1987). Houve também, o acometimento de outras doenças transmitidas por outros vetores, como é o caso da febre amarela, dengue, zika e chikungunya, que levaram a uma mudança nas prioridades e ao redirecionamento dos financiamentos voltados para o controle de doenças infecciosas; em conjunto, todos estes fatores contribuíram para o aumento do número de casos de malária (CARLOS et al., 2019). Além disso, a crise socioeconômica da Venezuela também refletiu no Brasil, uma vez que, aproximadamente 1,5 milhões venezuelanos deixaram o país, dos quais 400 mil vieram para o Brasil. Este fluxo migratório fez com que entre 2014 a 2017 aproximadamente 50 mil novos casos de malária fossem registrados em Roraima (AM), dos quais 20% importados da Venezuela (GRILLET et al., 2019).

Na região extra-amazônica, os casos importados e/ou autóctones correspondem a aproximadamente 1% (LORENZ et al., 2015). Embora em números inferiores àqueles detectados na região amazônica, a letalidade nesta região é alta, como demonstrado na figura 3. E o principal fator associado à alta letalidade nessas regiões é o diagnóstico e tratamento tardios (LORENZ et al., 2015; PINA-COSTA et al., 2014).

Figura 3: Número de casos de malária e letalidade registrados no Brasil de 2010-2018.



Número de casos de malária (linha contínua) registrados na região norte (vermelho) e região extra-amazônica (azul) à esquerda, e à direita a letalidade (linhas tracejadas) em cada região nos anos de 2010 a 2018. Fonte: DATASUS/SIVEP

A maior parte dos casos registrados na região extra-amazônica é decorrente do fluxo cada vez mais frequente de indivíduos viajando entre regiões endêmicas e não endêmicas, tanto da Amazônia legal quanto de países onde a doença é endêmica, como é o caso dos países africanos. Como resultado, surtos de transmissão autóctones de malária têm sido descritos em vários estados, incluindo Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo (CERAVOLO et al., 2009; COR C. J. FONTES, IAN BATHURST, 1991; LIMONGI et al., 2008; LORENZ et al., 2015).

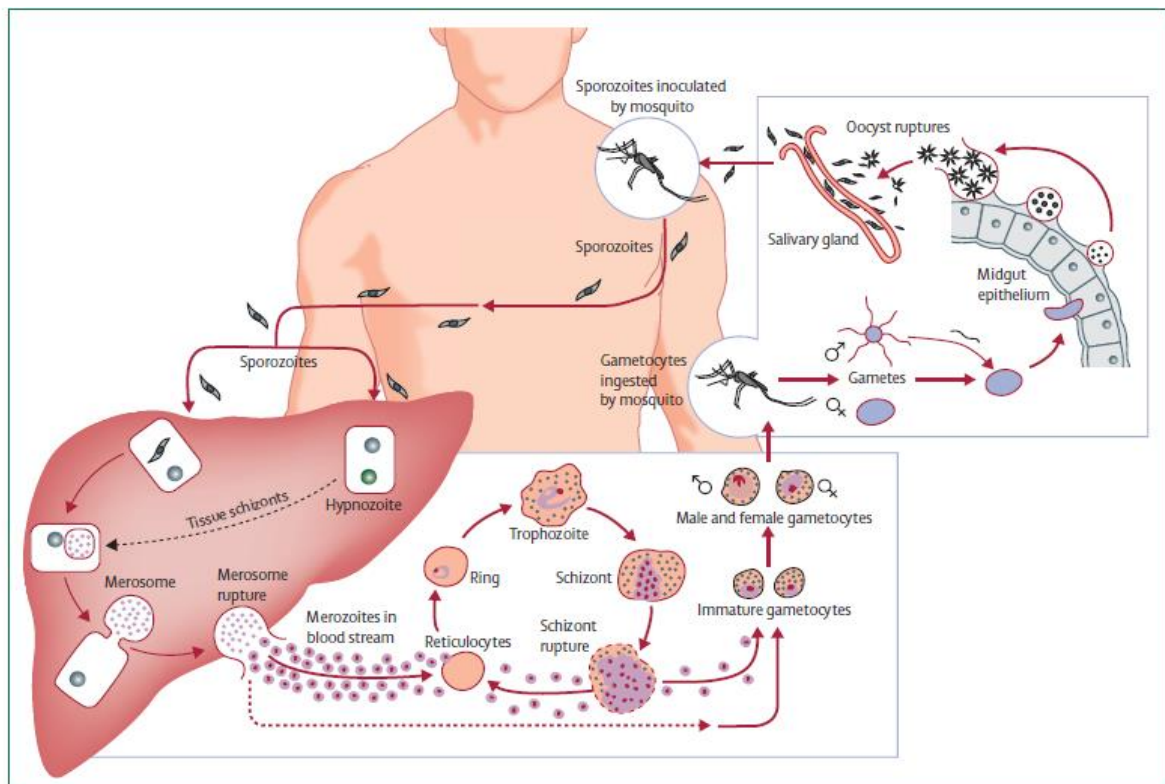
De relevância ainda na região extra-amazônica são os casos de transmissão autóctone de malária em regiões de Mata Atlântica (DE ALVARENGA et al., 2015). Nesta área tem crescido de importância a infecção humana pelo *P. simium*, uma espécie de *Plasmodium* de primatas não-humanos que é morfológica, imunologicamente e geneticamente similar ao *P. vivax*. (BRASIL et al., 2017; DE ALVARENGA et al., 2015; DEANE, 1992; PINA-COSTA et al., 2014). Atualmente,

existe um consenso que nestas regiões a malária atua como uma zoonose sendo os primatas não humanos os reservatórios da doença (BRASIL et al., 2017; DE ALVARENGA et al., 2015).

1.3 Ciclo biológico do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado

Os plasmódios possuem um ciclo heteróxico, ou seja, necessitam de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. A fase de reprodução sexuada ou esporogônica ocorre no hospedeiro invertebrado, enquanto a fase assexuada ou esquizogônica ocorre no hospedeiro vertebrado (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática do ciclo biológico do *Plasmodium vivax* no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*.



(Adaptado de Mueller *et al.*, 2009).

No hospedeiro vertebrado o ciclo inicia-se quando sua forma infectante, denominada esporozoítos é inoculada na pele do hospedeiro vertebrado durante o

repasto sanguíneo realizado por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Essas formas são alongadas com núcleo central e extremidades afiladas, podendo ser inoculados, juntamente com a saliva, de 15 a 200 esporozoítos (MEDICA; SINNIS, 2005). Após migrarem no tecido subcutâneo, por períodos variados, podem alcançar o sistema linfático, rota que parece importante para estimular o sistema imune (AMINO et al., 2006). Apenas aqueles esporozoítos que escapam do sistema imune vão atingir a circulação sanguínea e migrar para o fígado, dando continuidade ao ciclo de infecção do hospedeiro vertebrado. Para que a infecção por *Plasmodium* seja estabelecida, os esporozoítos devem alcançar, via circulação sanguínea, o endotélio do fígado e invadir as células-alvo, os hepatócitos, onde vão se desenvolver, dando início à fase hepática (ou exo-eritrocítica) da infecção.

Para dar início à fase hepática, o parasito precisa sair dos capilares sinusóides e invadir o parênquima hepático, e a interação entre o parasito e as células hepáticas pode ocorrer de diferentes maneiras. Foi demonstrado por Castillo e colaboradores (2015) que, inicialmente, os esporozoítos podem atravessar os hepatócitos dentro de vacúolos transitórios que antecedem a formação do vacúolo parasitóforo. Esse processo não requer a remodelação da membrana do vacúolo nem a liberação de organelas do parasito envolvidas no processo de invasão. Em seguida, os esporozoítos são internalizados por meio de uma junção móvel, que originará o vacúolo parasitóforo (MELLO-VIEIRA et al., 2020; RISCO-CASTILLO et al., 2015). Os esporozoítos podem, também, induzir o rompimento da membrana plasmática do hepatócito e atravessá-la, deslizando através do seu citoplasma (MOTA; RODRIGUEZ, 2001, 2004). Esse processo migratório leva à morte da maioria das células atravessadas, possivelmente devido ao comprometimento da permeabilidade de suas membranas (FORMAGLIO et al., 2014), mas foi demonstrado ser fundamental para que o parasito possa evadir do sistema imune do hospedeiro durante a fase inicial da malária (AMINO et al., 2008; MOTA; HAFALLA; RODRIGUEZ, 2002; MOTA; RODRIGUEZ, 2001).

Após invadir o hepatócito, ocorre a formação do vacúolo parasitóforo, onde o parasito se estabelece. Os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos pré-eritrocíticos, que durante a reprodução assexuada se multiplicam, por esquizogonia, originando esquizontes teciduais. Tais esquizontes são formas evolutivas arredondadas, multinucleadas e com citoplasma único, que darão origem aos merozoítos que são liberados na corrente sanguínea por meio de vesículas denominadas merossomos, que possibilitam aos merozoítos sua evasão do sistema imune do hospedeiro durante sua

migração do fígado até a circulação sanguínea, garantindo, assim, que a infecção das células sanguíneas ocorra de forma eficiente (STURM et al., 2006) . Além disso, no fígado, o *P. vivax* e o *P. ovale* podem se desenvolver em formas dormentes, denominadas hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas que ocorrem meses ou anos após a infecção inicial (MARKUS, 2015; WHITE, 2011). Ao atingirem a circulação sanguínea, os merozoítos penetram nos eritrócitos, dando início à fase eritrocítica do ciclo, responsável pela sintomatologia clínica da doença. Uma vez nos eritrócitos os merozoítos se diferenciam em trofozoítos imaturos, maduros e por fim esquizontes. Os esquizontes geram merozoítos que, por sua vez, penetram em outros eritrócitos, reiniciando o ciclo eritrocítico (COWMAN; CRABB, 2006).

Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, alguns deles se diferenciam nas formas sexuais do parasito, os macrogametócitos (feminino) e os microgametócitos (masculinos), os quais amadurecem sem sofrer divisão celular. O desenvolvimento dos gametócitos ocorre em cinco estágios distintos. Inicialmente, os estágios I e II são morfológicamente parecidos. Nos estágios III e IV os gametócitos são mais alongados, enquanto no estágio V eles apresentam extremidades mais arredondadas. As hemácias parasitadas com gametócitos são sequestradas na medula óssea, de onde migram para o espaço extravascular. O aumento da rigidez dos gametócitos imaturos favorece sua maturação no sistema hematopoiético, e a capacidade de deixar esse microambiente está possivelmente associada a restauração da sua deformabilidade. Com isso, os gametócitos retornam para a circulação sanguínea, sendo preferencialmente sequestrados nos microcapilares da pele, onde tornam-se facilmente acessíveis ao mosquito vetor (DE NIZ et al., 2018).

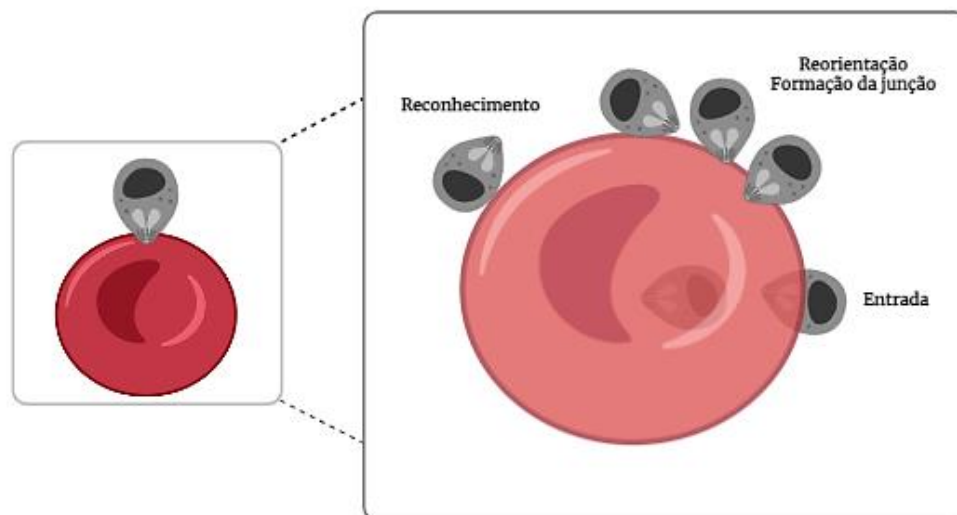
Estas formas sexuais são ingeridas pelo mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo dando início à fase sexuada do ciclo, que ocorre no interior do hospedeiro invertebrado. No trato digestivo do mosquito, os gametócitos se diferenciam em gametas masculinos e femininos, e dão origem ao zigoto (VLACHOU et al., 2006). Quando o zigoto se desloca em movimentos amebóides, ele é denominado oocineto e, por um mecanismo trans-celular, atinge a camada de células epiteliais do intestino médio onde se aloja entre o epitélio e a membrana basal e passa então a ser denominado oocisto (VLACHOU et al., 2004; ZIELER; DVORAK, 2002). A maquinaria de replicação de DNA e de síntese de proteínas está ativada no oocisto permitindo a multiplicação assexuada dos parasitos, e a produção milhares de

esporozoítos. Os esporozoítos, por sua vez invadem a hemolinfa do inseto e muitos conseguem invadir as glândulas salivares, podendo, num novo repasto sanguíneo, serem inoculados no hospedeiro vertebrado.

1.3.1 Processo de invasão dos reticulócitos pelo *P. vivax*

A invasão dos eritrócitos pelos parasitos da malária é a parte do ciclo que garante o sucesso da infecção humana e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença clínica. O processo de invasão é complexo, rápido e envolve várias etapas como representado na figura 5. Esse processo requer interações específicas entre ligantes presentes na superfície do parasito e receptores nas células sanguíneas (COWMAN; BERRY; BAUM, 2012; KANJEE et al., 2018b). Resumidamente, a invasão pode ser dividido em etapas: 1) reconhecimento e adesão reversível do merozoítos à superfície do eritrócito; 2) reorientação do merozoítos para que sua porção apical entre em contato com a membrana eritrocítica, formando uma junção irreversível entre as membranas do merozoítos e do eritrócito; 3) deslocamento da junção em direção ao polo posterior do parasito para que haja liberação do conteúdo apical (micronemas e roptrias); e ocorra a entrada do parasito no interior do eritrócito com a formação do vacúolo parasitóforo.

Figura 5. Representação esquemática do processo de invasão dos eritrócitos pelos parasitos da malária.



(Modificado de Teo *et al.*, 2016).

A seleção do *P. vivax* pelos reticulócitos acontece nas etapas iniciais do processo de invasão e envolve interações específicas entre proteínas do parasito e receptores do hospedeiro (KANJEE *et al.*, 2018a). Recentemente, vias de interação envolvendo uma família de proteínas que se ligam aos reticulócitos (RBPs, *reticulocyte binding-protein*) tem sido descritas, incluindo a proteína RBP2b com o receptor de transferrina CD71 (GRUSZCZYK *et al.*, 2018), e também a proteína RBP2a e o receptor CD98 (MALLERET *et al.*, 2021).

O *P. vivax* possui até o momento, uma única via bem caracterizada, dependente da interação entre a *Duffy binding protein* (DBP), proteína do complexo apical do parasito, e seu receptor expresso na superfície dos eritrócitos, o antígeno do grupo sanguíneo Duffy receptor para quimiocinas (*DARC, Duffy Antigen receptor for chemokines*) (ADAMS *et al.*, 1992; FANG *et al.*, 1991). A DBP é uma proteína presente nos micronemas do parasito que está associada com o decisivo e irreversível passo de formação da junção entre o merozoíto e a superfície da célula hospedeira durante o processo de invasão (ADAMS *et al.*, 1990; CHITNIS, 2001; CHOE *et al.*, 2005; GAUR; MAYER; MILLER, 2004; SINGH *et al.*, 2003).

A necessidade vital da interação DBP-DARC no processo de invasão da maioria dos isolados de *P. vivax* foi demonstrado pela baixa susceptibilidade de indivíduos DARC negativos a este parasito (LEVITT; SCHOEMAKER, 2006). Estes achados explicam a baixa prevalência de *P. vivax* no continente africano, onde a maior parte da população é DARC-negativa. Apesar disto, estudos recentes têm confirmado casos de malária vivax em indivíduos DARC negativos em algumas regiões endêmicas (NGASSA MBENDA; DAS, 2014; POPOVICI; ROESCH; ROUGERON, 2020; ZIMMERMAN, 2017), incluindo a Amazônia brasileira (CAVASINI et al., 2007). Entretanto, ainda não se sabe se esses casos são apenas eventos isolados, ou um fenômeno no qual o *P. vivax* possa estar se adaptando e usando receptores alternativos (GUNALAN et al., 2018).

1.4 Resposta de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea do *P. vivax*

Sabe-se que as infecções maláricas estão associadas a uma forte resposta imune (ANTONELLI et al., 2020; LONGLEY et al., 2017b). Neste contexto, a resposta de anticorpos naturalmente adquirida contra antígenos sanguíneos de *Plasmodium* tem sido amplamente estudada (CUTTS et al., 2014; FOLEGATTI et al., 2017; FOWKES et al., 2012; PIRES et al., 2018).

A resposta imune humoral a antígenos sanguíneos é um componente importante da resposta imune naturalmente adquirida à malária (MARSH; KINYANJUI, 2006; YAZDANI et al., 2006). Nos últimos anos uma maior ênfase tem sido dada as proteínas do parasito que possuem papel importante no processo de invasão dos eritrócitos, uma vez que estas proteínas são secretadas durante os sucessivos ciclos sanguíneos (CHAN et al., 2020; PAUL; EGAN; DURAISINGH, 2015). Assim, estas proteínas constituem alvos importantes para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle da doença que incluem uma vacina, ou o desenvolvimento de novas ferramentas de vigilância epidemiológica e diagnóstico (DRAPER et al., 2018; HE et al., 2019; LONGLEY et al., 2020).

Do ponto de vista de desenvolvimento de vacinas, os avanços relacionados a uma vacina contra o *P. falciparum*, espécie mais patogênica, progrediram consideravelmente nos últimos anos. Como resultado, vários antígenos sanguíneos de *P. falciparum* encontram-se em ensaios clínicos (DRAPER et al., 2018; THAM;

BEESON; RAYNER, 2017), como a vacina recombinante RTS,S já avaliada em ensaios de fase 3 em mais de 15.000 crianças africanas (LAURENS, 2018). Por outro lado, para *P. vivax*, poucos antígenos encontram-se nos estágios iniciais de ensaio clínico (BHARDWAJ et al., 2017; DE et al., 2021; SINGH et al., 2018). Isso demonstra que a pesquisa para o desenvolvimento de vacinas contra o *P. vivax* tem sido negligenciada.

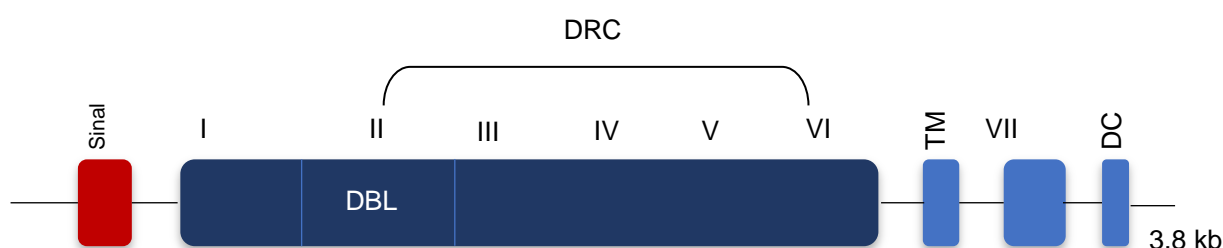
A resposta de anticorpos IgG específicos também tem demonstrado ser um importante aliado ao diagnóstico e vigilância epidemiológica em áreas de transmissão de malária (COOK et al., 2010; KUSI et al., 2017; PRIEST et al., 2016; ROGIER et al., 2015), e tem sido utilizados em várias partes do mundo para estimar a incidência e/ou prevalência de infecção em um determinado período de tempo (COOK et al., 2010; PIRES et al., 2018; PRIEST et al., 2016; WANG et al., 2016). Nesses trabalhos foram identificados e validados antígenos plasmodiais altamente imunogênicos e que permitam avaliar flutuações na transmissão (DRAKELEY et al., 2005) como é o caso de proteínas expressas na superfície dos merozoítos ou presente em mais de um estágio do parasito. Assim, a resposta de anticorpos demonstra sua importância para identificar indivíduos infectados, mesmo àqueles com infecções subpatentes, ou com histórico de infecção recente para que sejam direcionadas as medidas de controle (LONGLEY et al., 2020; METCALF et al., 2016).

1.4.1 Duffy Binding Protein (DBP): principal antígeno candidato à vacina contra as formas sanguíneas do *P. vivax*

A DBP (*Duffy Binding Protein*) constitui atualmente o principal antígeno candidato a vacina contra as formas sanguíneas do *P. vivax* (CHOOTONG et al., 2012; SINGH et al., 2018). Esta proteína faz parte de uma família de proteínas que se ligam aos eritrócitos (DBL-EBP) (ADAMS et al., 1992; GILBERGER et al., 2003; MAYER et al., 2001). Estruturalmente a DBP é dividida em sete regiões (Figura 6). O ligante funcional da DBP encontra-se localizado na região II da DBP (DBPII) e corresponde há cerca de 300 aminoácidos, sendo seu sítio de ligação ao eritrócito situado em um fragmento de 170 aminoácidos que contém as cisteínas 5 a 8 (RANJAN; CHITNIS, 1999; SINGH et al., 2003).

A DBP II, que é essencial na invasão dos eritrócitos, induz sob condições naturais anticorpos inibitórios (BIABs – *Binding Inhibitory Antibodies*), isto é, capazes de bloquear a interação ligante (DBP II) – receptor (DARC) (MICHON; FRASER; ADAMS, 2000). Estudos recentes têm mostrados que estes anticorpos induzem proteção contra a doença clínica em áreas endêmicas (HE et al., 2019; KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016).

Figura 6. Representação esquemática dos domínios estruturais da *Duffy binding protein* de *P. vivax*.



Na figura, estão representadas as sete regiões, sendo seis extracelulares (I-VI) e uma transmembrana (VII). Um domínio N-terminal rico em cisteína, o domínio de ligação DBL (região II), e um segundo domínio conservado rico em cisteína (região VI). O principal sítio de ligação para o reconhecimento do receptor é a porção central da DBP entre os aminoácidos 206 e 530 (C4 e C7), sendo esta, a porção mais polimórfica da proteína (Adaptado de Vanbuskirk *et al.*, 2004).

Diante da importância da resposta inibitória, faz-se necessário avaliar anticorpos anti-DBP não apenas pela sorologia convencional (ELISA-*enzyme-linked immunosorbent assay*) mas também através de ensaios *in vitro* que possam ser indicativos de anticorpos inibitórios (BIABs) contra o ligante (DBP II). Entretanto, a complexidade dos ensaios *in vitro* tem feito com que poucos grupos de pesquisa utilizem estas metodologias, como é o caso do nosso grupo de pesquisa (CERAVOLO et al., 2008; KANO et al., 2016; SOUZA-SILVA et al., 2014).

Na Amazônia brasileira, nosso grupo de pesquisa em malária (BMIM, IRR/Fiocruz) tem conduzido importantes trabalhos a fim de caracterizar o potencial da DBP II como candidato a vacina (DE SOUSA et al., 2014). O grupo demonstrou que essa proteína é naturalmente imunogênica, e que essa resposta aumenta em função

do tempo de exposição (CERAVOLO et al., 2010; CERÁVOLO et al., 2005). Além disso, em um estudo longitudinal conduzido na Amazônia brasileira, foi possível demonstrar que uma pequena parcela de indivíduos naturalmente expostos é capaz de desenvolver uma resposta de anticorpos inibitórios da interação DBPII-DARC (SOUZA-SILVA et al., 2014), corroborando achados anteriormente publicados por outros grupos de pesquisa (CHOOTONG et al., 2012; KING et al., 2008). Entretanto, embora poucos indivíduos desenvolvam uma resposta de anticorpos inibitórios, uma vez adquirida, esta resposta se mantém estável por um longo período (SOUZA-SILVA et al., 2014).

A razão pelo qual apenas uma pequena parcela de indivíduos seja capaz de desenvolver uma resposta inibitória ainda não é completamente conhecida, mas pode ser parcialmente explicada pelo polimorfismo genético na região do ligante (SOUSA et al., 2006, 2010) e susceptibilidade mediada pelo HLA-Classe II (KANO et al., 2016).

Análises prévias das variantes de DBPII (região do ligante) em amostras de campo já haviam demonstrado que esta região é hipervariável se comparada a outras regiões da proteína (TSUBOI et al., 1994). Os polimorfismos ocorrem frequentemente em certos resíduos em um padrão consistente com uma pressão seletiva na DBP, sugerindo que essa variação alélica seja um mecanismo de evasão imune (KHO et al., 2001; TSUBOI et al., 1994; VANBUSKIRK et al., 2004).

A diversidade no domínio do ligante dessa proteína representa um potencial problema que pode comprometer a eficácia de uma vacina, uma vez que esses polimorfismos presentes no ligante fazem com que a resposta ao *P. vivax* seja cepa específica (CERAVOLO et al., 2009; VANBUSKIRK et al., 2004). Assim, espera-se que vacinas baseadas na DBPII possam superar essa limitação de especificidade de resposta. Para tal, protótipos vacinais baseados em epítomos conservados da DBPII tem sido desenvolvidos (NTUMNGIA; ADAMS, 2012).

1.4.2 Protótipo vacinal baseado na DBPII: DEKnull-2

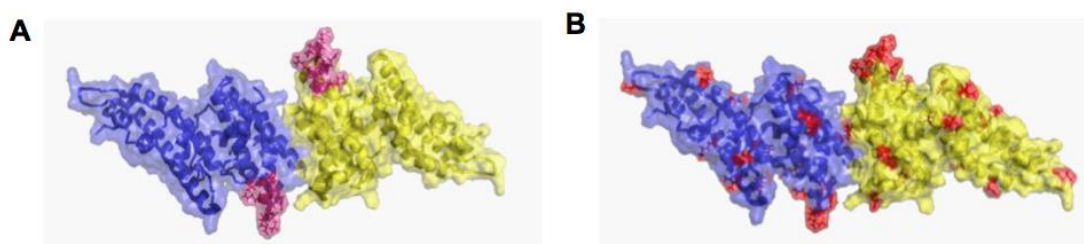
Em um estudo conduzido na Papua Nova Guiné por Chootong e colaboradores (2010) foi identificado um epítomo imunodominante e altamente polimórfico na região do ligante da DBP (DBPII). Esse epítomo - denominado DEK – é exposto à superfície

adjacente ao domínio de ligação DARC, e parece não ser funcionalmente importante para a ligação aos eritrócitos (BATCHELOR; ZAHM; TOLIA, 2011; VANBUSKIRK et al., 2004) . Com isso, protótipos vacinais têm sido desenvolvidos em uma tentativa de direcionar a resposta imune para outros sítios não polimórficos (NTUMNGIA; ADAMS, 2012).

Com o objetivo de contornar a limitação de resposta de anticorpos anti-DBPII cepa específica, o grupo de pesquisa do nosso colaborador (JH Adams, South Florida University, Tampa, FL, EUA) tem desenvolvido variantes sintéticas de DBPII onde o epítipo polimórfico DEK foi excluído, denominada família DEKnull (NTUMNGIA et al., 2015, 2017; NTUMNGIA; ADAMS, 2012). Neste sentido, dois protótipos vacinais se mostram mais promissores em animais de experimentação, DEKnull (Figura 7A) e DEKnull-2 (Figura 7B). Enquanto a DEKnull possui como característica a ausência de resíduos polimórficos e polares que estão presentes no epítipo DEK (DEKAQQRRK), a DEKnull-2 foi construída para eliminar todos os resíduos polimorfismos não-funcionais (isto é, que não são importantes para a invasão). Embora ambas as construções tenham sido imunogênicas em animais de laboratório (camundongos e coelhos), a DEKnull-2 se mostrou mais promissora induzindo elevados níveis de anticorpos contra diferentes variantes da DBPII, incluindo aqueles capazes de bloquear a interação ligante (DBPII) receptor (DARC) (NTUMNGIA et al., 2017).

No Brasil, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que indivíduos naturalmente expostos a malária vivax apresentam uma elevada e estável resposta de anticorpos IgG contra esse protótipo, quando comparado a cepa referência de DBPII Sal-1 e a variante Brz-1, que é a mais frequente na Amazônia brasileira (NTUMNGIA et al., 2017; PIRES et al., 2018). Assim, esta proteína tem potencial para ser utilizada em métodos que visem identificar proteção clínica, isto é, anticorpos direcionados contra epítopos conservados da DBPII que são alvos de imunidade protetora (CHEN et al., 2016; NICOLETE et al., 2016; NTUMNGIA et al., 2017).

Figura 7. Representação esquemática dos protótipos vacinais da família DEKnull.

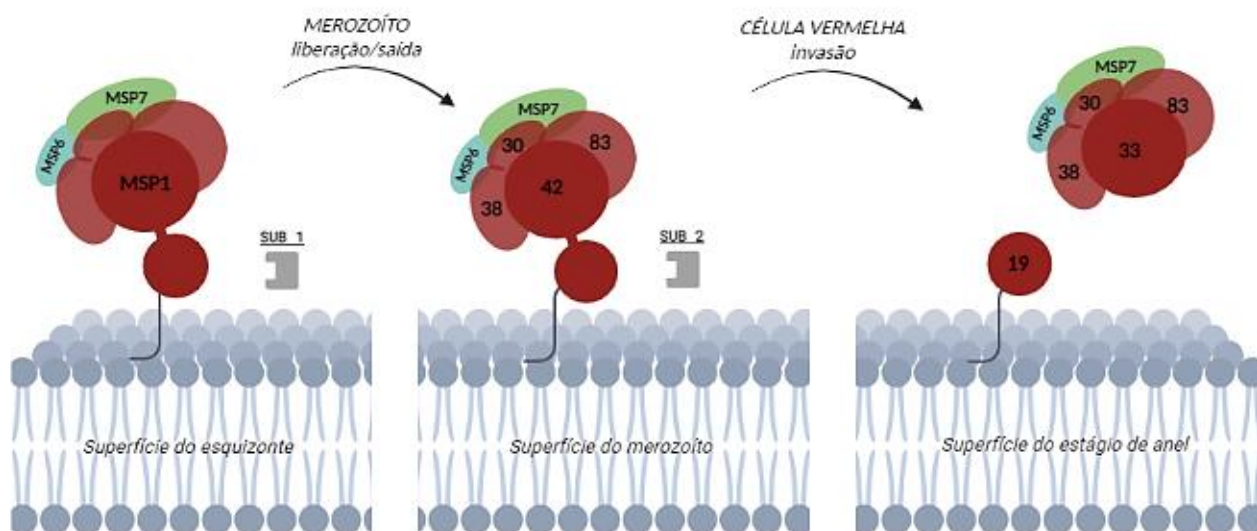


As estruturas estão representadas na forma dimérica, sendo cada monômero representado por uma cor (amarelo e roxo). A) DEKnull, sendo a localização original do epítipo DEK (DEKAQQRRK) ilustrada em rosa, e B) DEKnull-2 ilustrando em vermelho a localização de todos os epítipos polimórficos eliminados (NTUMNGIA et al., 2017).

1.4.3 Proteína de Superfície do Merozoíto-1 (MSP-1)

Estudos realizados para caracterizar a estrutura da superfície do merozoíto mostraram que o parasito nesta fase, é coberto por proteínas integrais de membrana e periféricas chamadas MSPs (*Merozoite Surface Proteins -MSPs*), que são responsáveis por mediar as interações iniciais e reversíveis entre o parasito e a célula sanguínea (KADEKOPPALA; HOLDER, 2010; KOUSSIS et al., 2009). Desta família de proteínas, a proteína de superfície do merozoito-1 (*Merozoite Surface Protein 1 - MSP1*) é a mais abundante. Nos parasitos da malária, essa proteína é sintetizada como uma proteína precursora de aproximadamente 200kDa que é ancorada a superfície do parasito através de uma ancora C-terminal, sendo processada em quatro fragmentos antes da ruptura das células sanguíneas contendo os merozoítos (BLACKMAN et al., 1990a). Um desses fragmentos é o C-terminal MSP1₄₂, que sofre uma clivagem durante a invasão do merozoíto nas células sanguíneas, formando MSP1₃₃ e MSP1₁₉. Ao final, MSP1₃₃ é liberado na circulação sanguínea, e MSP1₁₉ é o único fragmento que permanece ancorado na superfície do merozoíto (BLACKMAN et al., 1990b; FREEMAN; HOLDER, 1983) (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática do processo de montagem e processamento do complexo MSP1.



A proteína MSP1 é sintetizada e associada com outras proteínas que incluem, MSP6 e MSP7. Esse complexo é expresso na superfície do esquizonte em desenvolvimento e ancorada na membrana por uma ancora de GPI. Antes da liberação do merozoíto esse complexo sofre uma clivagem inicial mediada pela protease SUB1. Alguns produtos dessa primeira clivagem permanecem associados à membrana do merozoíto, e quando o merozoíto invade uma célula vermelha, uma nova clivagem mediada pela protease SUB2 acontece. Nesse momento, SUB2 cliva o fragmento MSP1 de 42kDa ancorado na membrana em outros dois fragmentos de 33 e 19 kDa. Posteriormente o complexo é liberado, e apenas o fragmento de 19kDa permanece ancorado à membrana. (Adaptado de Holder AA., 2009).

Cheng e colaboradores (2013) mostraram a capacidade de adesão da proteína MSP1-19 à eritrócitos humanos, evidenciando o potencial que esse antígeno tem de ser essencial no processo de invasão. Além disso, anticorpos de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax*, e soros obtidos com a imunização de camundongos com MSP1-19 foram capazes de inibir a interação *in vitro* entre MSP1-19 e eritrócitos (CHENG et al., 2013). Em um trabalho utilizando modelos murinos (macacos *Saimiri*), os autores demonstraram proteção parcial contra infecção com *P. vivax* após esquema de imunização com MSP1-19 (YANG et al., 1999). Mais recentemente, a importância da MSP1-19 foi reforçada por Dobrescu e colaboradores (2020) que demonstraram proteção contra malária grave, controle de parasitemia e balanço inflamatório em camundongos imunizados com MSP1-19 e desafiados com

P. berghei (DOBRESCU et al., 2020). Esses dados corroboram com trabalhos anteriormente publicados que revelaram uma forte imunogenicidade de MSP1-19 em camundongos imunizados (BARGIERI et al., 2007, 2008; PARWEEN; GUPTA; CHAUHAN, 2011), e ressaltam a relevância desse antígeno como candidato à vacina.

Uma característica importante da MSP1-19 é ser altamente conservado entre as espécies de *Plasmodium* (COOPER, 1993; DEL PORTILLO et al., 1991; SOARES et al., 1999b). Mas apesar de, a sequência gênica dos antígenos de MSP1-19 ser exclusiva para cada espécie de *Plasmodium*, um certo grau de homologia entre elas é observado (DAWSON et al., 2010), mesmo assim, estudos imunoepidemiológicos em áreas de baixa endemicidade, como o realizado na Somália por Bousema e colaboradores, não observaram uma correlação entre a resposta de anticorpos anti-MSP1-19 de *P. falciparum* e *P. vivax* (BOUSEMA et al., 2010). No Cambódia, Priest e colaboradores demonstraram que 79% das mulheres positivas para a resposta de anticorpos contra malária, apresentavam uma resposta de anticorpos anti-MSP1-19 apenas para uma espécie de *Plasmodium* (PRIEST et al., 2016). Com o objetivo de caracterizar a especificidade da resposta de anticorpos anti-MSP1-19 em áreas de alta endemicidade, Priest e colaboradores (2018) conduziram um estudo com amostras de Moçambique. Através de ensaio sorológico multiplex pela citometria de fluxo utilizando o antígeno MSP1-19 de *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*, os autores demonstraram que a resposta de anticorpos anti-MSP1-19 foi espécie específica, e que reatividade cruzada com outros plasmódios co-circulando na área ocorreu raramente (PRIEST et al., 2018). Esses dados corroboram com os anteriormente publicados por Amanfo e colaboradores, que demonstraram através de um estudo imunoepidemiológicos no Zimbábue que a resposta de anticorpos IgG contra MSP1-19 é espécie específico (AMANFO et al., 2016).

O potencial imunogênico da MSP1-19 já está bem caracterizado, e indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária apresentam elevada resposta de anticorpos contra esse antígeno (RODRIGUES et al., 2003; SOARES et al., 1997; SOUZA et al., 1999). Trabalhos realizados no Brasil, Turquia e Papua Nova Guiné demonstraram que indivíduos positivos para a resposta de anticorpos anti-MSP1-19 tinham uma maior chance de estarem infectados por *P. vivax* quando comparado aos indivíduos não-respondedores (FERNANDEZ-BECERRA et al., 2010; KANO et al., 2012; LIMA-JUNIOR et al., 2012; YILDIZ ZEYREK et al., 2011). Além disso, o nosso

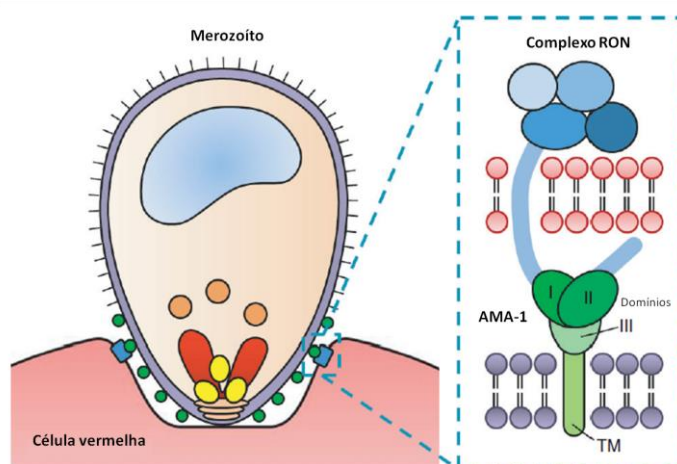
grupo de pesquisa demonstrou que existe uma forte relação entre o número de episódios prévios de malária, e a resposta de anticorpos anti-MSP1-19 de *P. vivax* (KANO et al., 2012). Outros trabalhos, como os realizados na Indonésia, e Cambódia utilizaram os dados sorológicos para determinar os índices de soroconversão e monitorar o padrão de transmissão local (FERREIRA; CASTRO, 2019; SURENDRA et al., 2019). Em um trabalho recém-publicado, que teve como objetivo identificar possíveis portadores de hipnozoítos com base na resposta de anticorpos, Longley e colaboradores (2020) demonstraram que indivíduos classificados como positivos contra um painel de antígenos o qual MSP1-19 estava incluído, tinham uma maior chance de desenvolver infecção por *P. vivax* dentro de 12 meses. Estes autores confirmaram que a estratégia de resposta sorológica pode ser importante não só para identificar indivíduos infectados, mas também prováveis portadores de hipnozoítos que seriam responsáveis pela manutenção na transmissão (LONGLEY et al., 2020). Juntos, esses dados colaboram para entender a dinâmica de transmissão, identificar população com maior risco de infecção, focos de transmissão, e conseqüentemente, direcionar as medidas de controle e eliminação.

1.4.4 Antígeno Apical de Membrana-1 (AMA-1)

O antígeno de membrana apical 1 (*Apical Membrane Antigen-1, AMA-1*) é um antígeno de estágios assexuados do parasito, que é sintetizado e localizado no complexo apical de esporozoítos e merozoítos e está presente em todas as espécies de *Plasmodium* (DUTTA et al., 2003; SILVIE et al., 2004).

É uma proteína integral de membrana tipo I, e é estruturalmente dividida em três regiões (I, II e III) (HODDER et al., 1996). AMA-1 é essencial para a invasão do merozoíto (HEALER et al., 2002; TRIGLIA et al., 2000), e os domínios I e II são funcionalmente críticos. Ambos os domínios são reconhecidos por anticorpos inibitórios *in vitro*, e, além disso, possuem *clusters* de polimorfismo que indicam que são alvos da resposta de anticorpos (KOCKEN et al., 2000; MÚFALO et al., 2008; NAIR et al., 2002). Durante a invasão AMA-1 é liberada pelos micronemas e exerce uma função essencial para formação da junção de movimento, que é usada pelo *Plasmodium* para mediar a invasão na célula vermelha (LIM et al., 2013; TRIGLIA et al., 2000) (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática da interação entre AMA-1 (verde) e o complexo RON (azul).



Durante a invasão o complexo RON é inserido na membrana da célula vermelha (vermelho) e a proteína AMA-1 na membrana do merozoíto (verde). Os domínios II e III estão diretamente envolvidos na interação com o complexo RON para formação da junção de movimento e reorientação do merozoíto. (Adaptado de Lim et al. 2013).

Assim como MSP1-19, AMA-1 é capaz de induzir uma elevada resposta de anticorpos durante a infecção por *P. vivax* (MOTEVALLI HAGHI et al., 2012). Indivíduos naturalmente expostos à malária são capazes de desenvolver uma forte resposta de anticorpos anti-AMA-1 (MÚFALO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2003; SALAVATIFAR et al., 2015), e diferentes trabalhos conduzidos no Brasil (MORAIS et al., 2006; MÚFALO et al., 2008; PIRES et al., 2018), Índia (SETH et al., 2010) e Sri Lanka (WICKRAMARACHCHI et al., 2006) demonstraram que essa resposta é desenvolvida mesmo em indivíduos com exposição limitada a malária.

Além disso, um trabalho realizado na Turquia que incluiu a avaliação da resposta de anticorpos a inúmeros antígenos de *P. vivax*, demonstrou que a resposta de anticorpos anti-AMA-1 estava associada a uma maior chance de infecção por *P. vivax* (YILDIZ ZEYREK et al., 2011). Esses dados corroboram com os achados de Fowkes e colaboradores (2012) que demonstraram que, mulheres grávidas residentes na Tailândia que apresentavam uma resposta de anticorpos anti-AMA-1, tinham quase cinco vezes mais chance de infecção por *P. vivax* (FOWKES et al., 2012).

Esse antígeno, é até o momento, o único alvo para o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* multi-estágio, uma vez que participa do processo de invasão

de esporozoítos (SILVIE et al., 2004) e merozoítos (LIM et al., 2013). Anticorpos naturalmente adquiridos são capazes de bloquear a interação ligante-receptor, e apesar de, a região do ligante com RON-2 ser flanqueada por uma região polimórfica que induz uma resposta cepa específica, foi identificado um epítipo associado à proteção (COLEY et al., 2007). Além disso, diversos trabalhos têm avaliado o potencial imunogênico de uma vacina recombinante baseada na região II de AMA-1 e mostraram que camundongos imunizados desenvolvem uma elevada resposta de anticorpos, incluindo anticorpos bloqueadores contra diferentes isolados de *P. vivax* (GENTIL et al., 2010; VICENTIN et al., 2014), além de resposta celular e proteção clínica (BOUILLET et al., 2011; LIMA et al., 2020). Em conjunto, esses dados demonstram o quão promissor é esse antígeno para o desenvolvimento de uma vacina.

1.5 Citometria de fluxo como potencial para avaliação da resposta de anticorpos a antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax*

Em geral, a pesquisa de anticorpos específicos contra proteínas recombinantes do *P. vivax* tem sido avaliada através da sorologia convencional empregando o ensaio de ELISA (CASSIANO et al., 2016; CERÁVOLO et al., 2005; PARK et al., 2001; ZAKERI et al., 2016). Em particular, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu importantes estudos imunoepidemiológicos em áreas endêmicas de malária, com o objetivo de avaliar a resposta imune a DBPII, principal antígeno candidato a vacina, utilizando a técnica de ELISA (CERAVOLO et al., 2010; CERÁVOLO et al., 2005; KANO et al., 2012, 2016; SOUZA-SILVA et al., 2014). Entretanto essa metodologia, apesar de amplamente utilizada, apresenta algumas desvantagens que incluem necessidade de uma grande quantidade de antígeno, e também de amostra biológica (soros e/ou plasmas), já que o ensaio avalia cada antígeno individualmente. Esta limitação da sorologia convencional tem feito com que essa metodologia seja gradualmente substituída por técnicas mais sensíveis, específicas e que permitem a utilização de uma plataforma multiplex através da combinação de antígenos recombinantes (CARINELLI et al., 2015).

Nesse contexto, os métodos baseados na citometria de fluxo tem se tornado uma ferramenta importante para realização de imunoensaios, permitindo o

desenvolvimento de tecnologias de matriz em suspensão (*SAT-suspension array technology*), que utilizam a citometria como ferramenta de análise simultânea da resposta de anticorpos de diferentes especificidades (CHAM et al., 2008; KOFFI et al., 2015; ONDIGO et al., 2012; SEIDEMAN; PERITT, 2002). Em geral, os ensaios sorológicos baseados na citometria de fluxo, utilizam microesferas permissíveis ao acoplamento covalente de antígenos na sua superfície, e que possuem um espectro de leitura específico. Com isso, as microesferas podem ser combinadas possibilitando então a realização de ensaios multiplex (FOUDA et al., 2006).

A citometria de microesferas já tem sido usada para determinação da resposta de anticorpos específicos contra várias doenças incluindo Tétano, Difteria (PICKERING et al., 2002b), e meningites bacterianas (LAL et al., 2004, 2005; PICKERING et al., 2002a). Para malária, esta metodologia tem sido utilizada principalmente para avaliar a resposta imune a antígenos candidatos à vacina (LONGLEY et al., 2017a; ONDIGO et al., 2012; PERRAUT et al., 2014), e também tem sido um importante aliado no desenvolvimento de ferramentas que auxiliem na vigilância epidemiológica através da identificação de marcadores de exposição (CUTTS et al., 2014; FOLEGATTI et al., 2017; KUSI et al., 2017; LONGLEY et al., 2017b; WANG et al., 2016).

Em conjunto, esses dados reforçam o quão acessível essa metodologia tem se tornado para atender as necessidades que envolvem a avaliação da resposta de anticorpos, tanto para avaliação da imunogenicidade quanto para o desenvolvimento de ferramentas de vigilância, contra as mais diversas doenças.

2. Justificativa

A malária causada pelo *P. vivax* atinge milhões de pessoas no mundo sendo responsável por grande parte da morbidade da malária humana, causando prejuízos significativos às comunidades que vivem em áreas endêmicas (NAING et al., 2014; WHO, 2019). Considerando que as medidas de controle atualmente disponíveis apresentam limitações, faz-se necessário intensificar esforços para o desenvolvimento de metodologias alternativas que possam efetivamente contribuir para o controle e eliminação da doença em longo-prazo (RECHT et al., 2017). Para isso, torna-se necessário avaliar a resposta imune contra os principais antígenos candidatos à vacina, ou marcadores de exposição, em diferentes áreas endêmicas,

considerando o novo perfil epidemiológico de transmissão reduzida da malária no Brasil e no mundo (CUTTS et al., 2014; WHO, 2020).

Em relação aos candidatos à vacina contra o *P. vivax*, o antígeno mais promissor é a DBPII, já que esta proteína participa da principal via de invasão utilizada pelo parasito para invadir os eritrócitos, garantindo assim a infecção humana (COWMAN; CRABB, 2006). Embora os ensaios sorológicos de rotina sejam importantes para caracterizar a resposta de anticorpos antígeno-específicos, estes ensaios não permitem avaliar se estes anticorpos têm habilidade de inibir a invasão do parasito na célula hospedeira. Portanto, do ponto de vista do desenvolvimento de vacinas baseadas na DBPII, faz-se necessário avaliar a qualidade destes anticorpos, isto é, se eles são capazes de bloquear a interação do ligante parasitário (DBPII) com o seu receptor eritrocítico (DARC). Isto é particularmente importante para vacinas baseadas na DBPII pois estes anticorpos inibitórios estão associados à proteção clínica (COLE-TOBIAN et al., 2009; HE et al., 2019; NICOLETE et al., 2016).

No caso do *P. vivax*, as metodologias disponíveis para a avaliação de anticorpos bloqueadores in vitro da interação ligante-receptor (BIAbs) possuem limitações (CHOTIVANICH et al., 2001). Atualmente, o maior obstáculo para realização de ensaios inibitórios da invasão do *P. vivax* nos reticulócitos é a falta de um protocolo bem estabelecido para cultivo contínuo das formas sanguíneas de *P. vivax* (ARMISTEAD; ADAMS, 2018). Diante disso, inúmeros ensaios de invasão utilizando culturas de curta duração tem sido propostos, entretanto, o tropismo de *P. vivax* por reticulócitos jovens (CD71 positivos) fazem com que esses ensaios tenham limitações, pois dependem de quantidades relativamente significativas de reticulócitos (NOULIN et al., 2012, 2013; RUSSELL et al., 2011). De relevância, outros ensaios que avaliam indiretamente a invasão tem sido propostos, particularmente, plataformas que avaliam a inibição da interação DBPII-DARC. Incluem-se neste critério os ensaio de transfecção com células de rim de macaco (COS-7) (MICHON; FRASER; ADAMS, 2000) ou aqueles que utilizam o receptor DARC recombinante (SHAKRI; RIZVI; CHITNIS, 2012). Entretanto, todas estas metodológicas são complexas e demandam uma quantidade significativa de amostra biológica (soros/plasmas). Neste contexto, a proposta aqui apresentada visou desenvolver uma metodologia mais simples para avaliar anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor na infecção pelo *P.*

vivax, com foco nos ensaios multiplex associados a citometria de fluxo (Objetivos específicos 1 e 2).

Considerando ainda o potencial da citometria de fluxo para (i) avaliar grande número de antígenos com quantidades relativamente pequena de amostra biológica e (ii) disponibilidade na maioria dos laboratórios de referência do Sistema Único de Saúde (SUS), a segunda hipótese investigada foi a de que era possível desenvolver um método diagnóstico de detecção de anticorpos pela citometria multiplex para identificar infecção e/ou exposição recente ao *P. vivax* (Objetivo específico 3 e 4). Considerando que a resposta de anticorpos contra as formas sanguíneas dos parasitos da malária pode ser de longa-duração, o método aqui proposto destina-se a áreas não endêmicas e/ou com transmissão esporádica de malária, como é o caso da região extra-amazônica brasileira.

3. Objetivos

Padronizar uma plataforma de sorologia multiplex pela citometria de fluxo para avaliar a resposta de anticorpos contra antígenos sanguíneos de *P. vivax* envolvidos na invasão da célula hospedeira ou associados a infecção aguda e/ou recente

3.1 Objetivos específicos:

- (i) Determinar as melhores condições para realização do ensaio de citometria de fluxo multiplex para anticorpos baseados na DBPII, incluindo o acoplamento dos antígenos às microesferas;
- (ii) Analisar a capacidade do ensaio multiplex para identificar indivíduos que apresentam anticorpos inibitórios da interação DBPII-DARC;
- (iii) Padronizar e avaliar a resposta de anticorpos IgM e IgG contra antígenos sanguíneos altamente imunogênicos de *P. vivax* em indivíduos primoinfectados pelo *P. vivax*
- (iv) Avaliar a cinética da resposta de anticorpos contra antígenos sanguíneos de *P. vivax* pela citometria de fluxo durante primoinfecção.
- (v)

4. Desenho metodológico e abordagem experimental

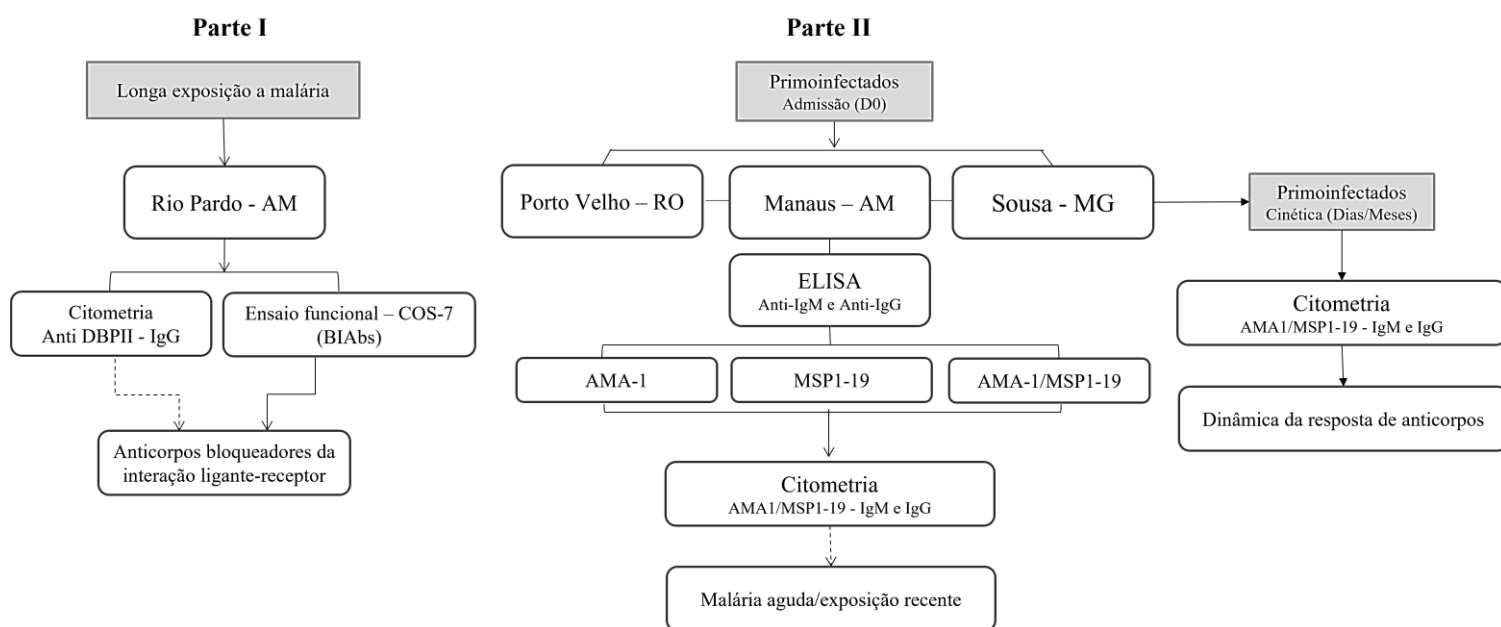
O presente estudo envolve duas abordagens experimentais (Figura 10). A primeira refere-se ao uso da metodologia de citometria de fluxo para identificar indivíduos que potencialmente apresentam uma resposta de anticorpos protetores contra o *P. vivax*, caracterizada aqui pela presença de anticorpos inibitórios da interação ligante (DBPII) – receptor DARC (BIAbs).

A presença dos anticorpos inibitórios tem sido avaliada através do ensaio funcional de referência utilizando células COS-7 expressando a DBPII, como já padronizado pelo grupo (CERAVOLO et al., 2008, 2009; SOUZA-SILVA et al., 2014). Para isso, foram incluídos no estudo indivíduos com histórico de longa exposição à malária, residentes em um assentamento agrícola do Estado do Amazonas (item 4.1.1), onde nosso grupo tem conduzido um estudo de base populacional de longa duração (KANO et al., 2012, 2016; SOUZA-SILVA et al., 2014). A metodologia envolve avaliar a resposta de anticorpos tanto pelo ensaio funcional de referência (controle positivo) quanto no ensaio multiplex pela citometria de fluxo aqui desenvolvido (diagnóstico teste). Para o ensaio multiplex três construções de DBPII foram utilizadas, para determinação da resposta contra epítomos polimórficos (DBPII Sal-1 e DBPII Brz-1) e epítomos conservados (DEKnull-2) (Figura 7). Os resultados visam identificar indivíduos que possam apresentar uma resposta de anticorpos inibitórios através da associação entre o padrão de resposta na sorologia multiplex e o ensaio funcional.

Na segunda parte desse trabalho, buscou-se padronizar um ensaio sorológico pela citometria de fluxo para identificar indivíduos com infecção ou exposição recente ao *P. vivax* (Parte II). Para tal, incluímos um grupo de amostras de indivíduos residentes da região extra-amazônica expostos a um episódio único de transmissão de malária por *P. vivax*, ocorrido durante um surto epidêmico na região metropolitana de Belo Horizonte (item 4.1.2), distrito de Rio Manso (comunidade de Sousa), MG (CERAVOLO et al., 2009). Também foram incluídas amostras de indivíduos infectados pela primeira vez pelo *P. vivax* (primoinfectados) e procedentes de duas regiões endêmicas no Brasil. Foram incluídos pacientes que buscaram o serviço de referência em malária de Porto Velho (RO) e Manaus (AM), na região da Amazônia (item 4.1.3). As amostras plasmáticas desses indivíduos foram submetidas tanto ao ensaio de sorologia convencional (ELISA) quanto ao ensaio sorológico aqui desenvolvido pela

citometria de fluxo. A metodologia buscou avaliar anticorpos IgM e IgG contra uma proteína quimérica de *P. vivax* (AMA-1/MSP1-19) previamente descrita que incluem antígenos de formas sanguíneas altamente imunogênicos (ROCHA et al., 2017)

Figura 10. Fluxograma referente ao desenho experimental do estudo que visa identificar anticorpos contra as formas sanguíneas do *P. vivax*, sejam bloqueadores da interação ligante-receptor (Parte I) ou indicativos de infecção aguda e/ou exposição recente (Parte II).



À esquerda está representado o desenho experimental da primeira parte do trabalho, que teve como objetivo avaliar a resposta de anticorpos bloqueadores da interação DARC-DBP11 em amostras de indivíduos residentes em área endêmica de malária, Rio Pardo (n=245), através da metodologia bem estabelecida de ensaio funcional usando células COS-7, bem como o ensaio multiplex aqui descrito. À direita está representado o desenho experimental da segunda parte desse trabalho, que tem como objetivo utilizar a resposta de anticorpos à antígenos altamente imunogênicos de *P. vivax* para determinar infecção presente ou recente por *P. vivax*. Para tal, foram utilizadas amostras de indivíduos com primoinfecção pelo *P. vivax* de diferentes regiões no Brasil (n=85). A avaliação da resposta de anticorpos IgM e IgG foi avaliada pela sorologia convencional de ELISA e, também pela metodologia de sorologia pela citometria aqui proposta. Parte dos indivíduos primoinfectados foram acompanhados, por dias/meses após o diagnóstico.

4.1 Áreas de estudo e voluntários

4.1.1 Indivíduos com histórico de longa exposição à malária vivax: Comunidade de Rio Pardo

A população de Rio Pardo faz parte de uma comunidade rural do estado do Amazonas, localizada na municipalidade de Presidente Figueiredo a 139Km de Manaus (Figura 11). A comunidade criada em 1996 como parte dos projetos de assentamento agrícola do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) (DE CASTRO et al., 2006). Atualmente, cerca de 120 famílias vivem no assentamento, incluindo famílias assentadas em áreas denominadas de “ramais” - vias não pavimentadas -, e às margens do Igarapé de Rio Pardo (população ribeirinha).

Em novembro de 2008, o grupo de pesquisa em Biologia e Imunologia da Malária (BMIM) do IRR/FIOCRUZ iniciou um estudo de base populacional na população de Rio Pardo, cujo objetivo principal era caracterizar, do ponto de vista imunológico e epidemiológico, esta população que tinha história de longa exposição à transmissão de malária. O desenho detalhado do estudo foi previamente descrito pelo grupo (KANO et al., 2012; SOUZA-SILVA et al., 2014). Resumidamente, os seguintes procedimentos foram realizados durante o recrutamento dos voluntários (linha de base): (i) aplicação de um questionário estruturado para todos os voluntários a fim de obter dados demográficos, epidemiológicos e clínicos; (ii) exames físicos dos indivíduos, incluindo temperatura corporal e avaliação do tamanho do fígado e do baço; (iii) pesquisa de malária no sangue periférico através da microscopia óptica (diagnóstico de rotina), e ensaios moleculares de PCR; e (iv) coleta de sangue, sendo que dos indivíduos acima de cinco anos de idade foi coletado sangue venoso (10mL em EDTA) e das crianças com menos de cinco anos de idade, através da punção digital (coletado em papel filtro). Seis e doze meses após a linha de base (Junho e Novembro de 2009) foram realizados mais dois cortes transversais seguindo os mesmos procedimentos descritos para a linha de base.

Para o presente estudo, os critérios de seleção dos voluntários foram (i) ter participado de no mínimo dois dos três cortes transversais do estudo longitudinal (linha de base, 6 e 12 meses de acompanhamento) (ii) indivíduos adultos com algum grau de imunidade naturalmente adquirida, pré-estabelecida aqui como ter histórico de

longa exposição à malária e resposta de anticorpos pela sorologia convencional (ELISA) contra diferentes construções de DBPII (DEKnull-2, DBPII Sal-1 e DBPII Brz-1). Assim, 310 indivíduos, com amostras biológicas disponíveis no biorepositório, atenderam a esses critérios. No presente trabalho, incluímos amostras de 85 indivíduos (85/310) para serem avaliadas (n=245 amostras).

Figura 11. Mapa do estado do Amazonas, região noroeste do Brasil, mostrando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo, dentro da municipalidade de Presidente Figueiredo (representado em cinza), localizado a aproximadamente 160Km de Manaus.



4.1.2 Indivíduos primoinfectados de área não-endêmica de malária: Sousa-Minas Gerais

No período de abril a maio de 2003 foi descrito pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais e Coordenação de Gestão da Região metropolitana de Belo Horizonte, um surto de malária no distrito de Sousa, município de Rio Manso, localizado a 79 km de Belo Horizonte. O inquérito epidemiológico identificou como fonte provável do surto um morador de Sousa que retornou do município de Humaitá, no estado do Amazonas, no final de 2002 e apresentou episódios de recaídas de malária pelo *P. vivax*.

Na ocasião, nosso grupo de pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária do IRR/Fiocruz Minas, conduziu um estudo, do tipo longitudinal, para caracterizar a resposta imune humoral contra a DBP (CERAVOLO et al., 2009). O estudo realizado foi do tipo caso-controle incluindo 15 dos 25 (60%) indivíduos diagnosticados com malária no momento do surto e com sintomas (casos). Esses indivíduos foram acompanhados por cerca de 12 meses para avaliar a duração da resposta de anticorpos contra a DBP após uma única exposição ao *P. vivax* (CERAVOLO et al., 2009).

As amostras foram coletadas nos períodos de 3, 6 e 12 meses após o surto e mantidas no biorrepositório do grupo de pesquisas de Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM) do Instituto René Rachou e utilizadas para avaliação do perfil da resposta de anticorpos anti- *P. vivax*.

4.1.3 Indivíduos primoinfectados de área endêmica de malária: Manaus e Porto Velho

Foram incluídos no presente trabalho amostras de 70 indivíduos com infecção aguda pelo *P. vivax* e que relataram nunca ter tido infecção malárica prévia (primoinfectados residentes em área endêmica de malária). Estes pacientes foram recrutados em centros de referência de diagnóstico de malária em Manaus (AM) ou Porto Velho (RO), onde a infecção por *P. vivax* foi confirmada por microscopia. Em Manaus foram recrutados na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, FMT-HDV, Amazonas) sob a supervisão do Dr. Pritesh Lalwani (Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Manaus) (SANTOS et al., 2020). Além destes, amostras de outros 13 pacientes admitidos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) entre 2012-2014 e diagnosticados com malária vivax foram coletadas sob a supervisão do Dr. Dhélio Batista Pereira (CEPEM, Porto velho, RO). Amostras de plasma foram coletadas nos dias zero (admissão), e até 28 dias após em ambos os grupos.

A tabela 1 resume os dados demográficos, laboratoriais e clínicos, dos pacientes de *P. vivax* de Manaus e Porto Velho no momento do recrutamento. A mediana de idade foi 36 anos, sendo em sua maioria homens, que apresentavam há cerca de 5 dias sintomas de malária aguda não complicada (tais como febre, cefaleia,

mialgia). A mediana de parasitemia dos pacientes determinada pela microscopia foi de 1.646 parasitos/mm³. Os níveis hematológicos demonstraram que os pacientes não apresentavam plaquetopenia, entretanto, 30% (21/70) dos pacientes estavam anêmicos, sendo 13% (9/70) mulheres e 17% (13/70) homens. Além disso, 64% (45/70) dos pacientes apresentaram níveis de leucócitos inferiores a $4,5 \times 10^3$, que condizem com um quadro de leucopenia. No momento do diagnóstico, todos os pacientes receberam tratamentos para malária causada por *P. vivax*, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020)

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e hematológicas dos 70 indivíduos agudos primoinfectados residentes em área endêmica de malária envolvidos no estudo.

Características	
Mediana de idade, anos (IQR)*	36 (26,5-49)
Gênero, homem: mulher	1,95:1
Dias de sintoma, mediana (IQR)**	5 (4-7)
Parasitemia, parasitos/mm ³	1646 (609-3692)
Contagem de leucócitos, $\times 10^3/\mu\text{l}$	4 (3 - 5,1)
Contagem de plaquetas, $\times 10^4/\mu\text{l}$	8,7 (6,7 -11,1)
Nível de hemoglobina, g/dL	
Homem	13,9 (12,9-15,1)
Mulher	13,2 (11,1-14,7)

*IQR-Intervalo Interquartil

**Baseado no relato do paciente.

Anemia: hemoglobina < 13g/dL (homem), < 12g/dL (mulher)

Trombocitopenia: Contagem de plaquetas < $5,0 \times 10^4$

Leucopenia: Contagem de leucócitos < $4,5 \times 10^3/\mu\text{l}$

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética (Protocolo CEPESH/CPqRR No.007/2006 e No.07/2009). Todas as amostras encontram-se adequadamente estocadas no Biorrepositório do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária (CAAE 50522115.7.0000.5091 Guardiões Luzia H Carvalho e Flora S Kano,

de acordo com a legislação vigente (Portaria nº2201, do Ministério da Saúde de 14 de setembro de 2011).

4.1.4 Painel de amostras controle de indivíduos nunca expostos à malária: Belo Horizonte – Minas Gerais

Indivíduos adultos e saudáveis, sem história de exposição previa a malária, residentes em área não endêmica de malária (Belo Horizonte) foram incluídas no estudo (grupo controle negativo). No total, 20 indivíduos adultos tiveram suas amostras coletadas por ocasião de doação de sangue. Os doadores tiveram todos os testes sorológicos realizados para doenças infecciosas em banco de sangue negativos. As amostras fazem parte do biorrepositório do Grupo de Pesquisas Integradas em Biomarcadores (GIPB) e foram gentilmente cedidas pela Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (coorientadora).

4.2 Antígenos recombinantes

4.2.1 Proteína de ligação ao antígeno Duffy, região II (Duffy binding protein II, DBPII).

As proteínas DBPII recombinantes (variantes Brz-1 e Sal-1), correspondendo a região do ligante da DBP (região II, aminoácidos 243 a 573, 39kDa), foram produzidas no Laboratório de Malária do IRR/Fiocruz, conforme protocolos bem estabelecidos e rotineiramente utilizados pelo grupo (NTUMNGIA; ADAMS, 2012; SOUZA-SILVA et al., 2014). Resumidamente, as sequências codificantes da região de interesse foram clonadas em um plasmídeo (pET21a+, Novagen) específico para expressão em *Escherischia coli* (*E. coli*). Os plasmídeos resultantes foram usados para transformação em *E. coli* BL21 (DE3) LysE (Invitrogen) e as colônias positivas foram estocadas no glicerol a -80°C. As proteínas expressas foram purificadas dos corpos de inclusão sob condições desnaturantes, e purificadas utilizando cromatografia de afinidade com uma coluna de níquel Sefarose 6 (GE Healthcare). As frações eluídas tiveram sua pureza checada por meio de separação por gel SDS PAGE e aquelas frações puras foram submetidas ao processo de refolding segundo protocolo descrito por Singh e colaboradores (2001) (SINGH et al., 2001), e a qualidade do refolding foi avaliada com o teste de DTT (dithiothreitol).

4.2.2 Antígeno sintético: DEKnull-2

O protótipo vacinal baseado na DBPII, DEKnull-2 (NTUMNGIA; ADAMS, 2012) foi produzido segundo protocolo descrito por Ntumngia e colaboradores (2012). Resumidamente, a sequência que codifica a região II da DBP da cepa referência Sal-1 (DBPII) foi utilizada como modelo. Uma vez realizadas as modificações, a sequência codificadora foi clonada em plasmídeo (pET21a+, Novagen). O plasmídeo resultante foi transformado em *E.coli* BL21 (DE3) para expressão dos protótipos recombinantes, e purificação dos corpos de inclusão e refolding foi realizada conforme descrito no item 4.2.1. A proteína foi produzida pela Dra. Camilla Valente (BMIM, IRR/Fiocruz), durante seu pós-doutorado no laboratório do nosso colaborador Dr. John H. Adams (University of South Florida, Tampa, EUA).

4.2.3 Proteína quimérica baseada na Proteína de Superfície do Merozoíto 1-19 (MSP1-19) e no Antígeno Apical de membrana 1 (AMA-1)

Uma proteína quimérica que corresponde à fusão dos antígenos AMA1-66 e MSP1-19 também foi incluída nesse trabalho. O antígeno foi desenvolvido e recém descrito pela Dra. Irene Soares (ROCHA et al., 2017). A proteína quimérica foi produzida com sucesso em levedura *Pichia Pastoris*, e demonstrou ser altamente imunogênica, sendo capaz de induzir altos títulos de anticorpos em camundongos imunizados.

Além disso, as proteínas individuais também foram utilizadas. A proteína de superfície do merozoíto 1 utilizada no estudo correspondente a região C-terminal de 19kDa (MSP1-19, aminoácidos entre 1616 a 1704, 19kDa), bem como o antígeno apical de membrana 1-66 (AMA1-66 ectodomínio, aminoácidos entre 43 a 487) e foram gentilmente cedidos pela Dra. Irene Soares (Universidade de São Paulo, Brasil). Os detalhes da construção dessa proteína foram descritos anteriormente em (SOARES; RODRIGUES, 2002; VICENTIN et al., 2014).

4.3 Ensaio imuno-enzimático (ELISA)

A detecção de anticorpos IgM e IgG foi realizada pela técnica *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), conforme protocolos bem estabelecidos pelo grupo

(CERÁVOLO et al., 2005). Resumidamente, as placas (Maxysorp, Nunc, Denmark) foram sensibilizadas com os antígenos de interesse na concentração de 3 μ g/mL, e mantidas a 4°C por 12 horas. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS 1x pH 7,2 + 0,05% Tween20 + 5% leite em pó desnatado) por 1 hora. Em seguida, as amostras de plasma diluídas 1:100 foram adicionadas na placa e incubados durante 1 hora a 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBST (PBS 1x + 0,05% Tween 20) e 100 μ L do conjugado anti-IgG humano ligada à peroxidase (Sigma-Aldrich, A8792) na diluição de 1:5.000 foram adicionados. A revelação foi realizada com o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD-Sigma-Aldrich). O cálculo do ponto de corte (*cut off*) para cada proteína foi calculado utilizando a média da DO490nm de 30 plasmas de indivíduos negativos (oriundos de área não endêmica) mais 3 vezes o desvio padrão.

Para detecção de anticorpos IgM humano específicos foi utilizado o mesmo protocolo e condições descritos acima para detecção de IgG, diferindo apenas no anticorpo secundário, o conjugado anti-IgM humano ligado a peroxidase (Sigma-Aldrich, A6907) diluído 1:10000. O procedimento de revelação, obtenção de cut-off e determinação da positividade seguiu conforme descrito acima.

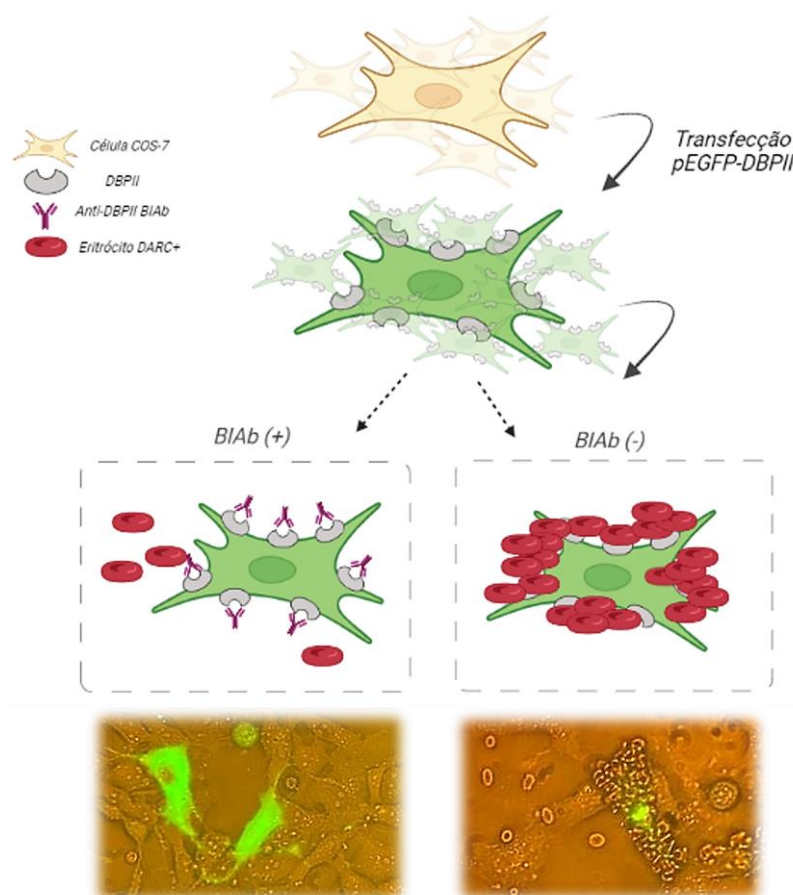
4.4 Transfecção de células COS-7 e ensaio funcional

Os ensaios funcionais para a detecção de anticorpos capazes de bloquear a interação DBPII-DARC foram conduzidos conforme protocolos bem estabelecidos pelo grupo (CERAVOLO et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2014). Para tal, empregou-se uma linhagem de células de mamíferos permissíveis à transfecção, COS-7, originalmente isolada a partir de células de rim de primata não humano africano, e modificada pelo vírus SV 40 (American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, VA). As células COS-7 foram mantidas em garrafas de cultura de 75cm² (Corning Incorporated, EUA) contendo 10mL do meio de cultura Dulbecco's Minimal Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA) completo, que contém 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, EUA), 25mM de bicarbonato de sódio, 2mM de L-glutamina-PS (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA) e 25mM de HEPES (Sigma). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade, sendo os

repiques realizados a cada dois dias, utilizando-se solução de tripsina e EDTA a 0,25% (Gibco), conforme protocolo padrão.

O plasmídeo utilizado para transfecção das células COS-7 foi construído previamente pelo nosso grupo de pesquisa e contém o gene da DBP_{II} da variante de *P. vivax* mais frequente no Brasil – DBP_{II} Brz1 (Souza-Silva *et al.*, 2010). Para os ensaios de transfecção utilizou-se a lipofectamina e reagente Plus (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), nas concentrações e protocolos indicados pelo fabricante. Resumidamente, as células COS-7 foram adicionadas às placas de cultura de seis poços (Nunc, Denmark) (4×10^5 células/poço) e então transfectadas com 0,5µg/poço de DNA plasmidial e complexos de lipossomos (5% de reagente Plus e 3% de lipofectamina) em meio de cultura DMEM (Gibco-BRL Life Technologies, Rockville, MD) incompleto, que contém 25mM de bicarbonato de sódio, 2mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation Rockville, MD, EUA) e 25mM de HEPES (Sigma). Após 6h de incubação do complexo lipossoma-DNA (37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade), o meio de transfecção foi substituído por meio DMEM contendo 20% de soro bovino fetal (SBF) inativado. As placas foram incubadas a 37°C. Após 24h, o meio de cultura foi novamente substituído por meio DMEM completo, e a eficiência da transfecção verificada por meio da visualização das células em um microscópio de fluorescência. Quarenta e oito horas após a transfecção, as placas foram lavadas com meio DMEM incompleto, e as células incubadas com os soros/plasmas-testes (37°C, 1h, 5% de CO₂) diluídos (1:40) em meio DMEM incompleto. Posteriormente, foram adicionados 200µL/poço de uma solução a 10% de eritrócitos humanos O, Duffy/DARC positivos em meio DMEM incompleto e as placas incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Ao final da incubação, as placas foram lavadas três vezes com meio DMEM incompleto, para remoção dos eritrócitos não aderentes. As rosetas formadas a partir da interação ligante-receptor foram quantificadas (10 campos/poço) em um microscópio estereoscópio de fluorescência invertido e com contraste de fase (200x) (Nikon, Melville, NY, USA). As rosetas só foram quantificadas quando eritrócitos aderentes cobriram mais que 50% de sua superfície celular (MICHON; FRASER; ADAMS, 2000). A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula $100 \times (R_c - R_t)/R_c$, onde R_c é a média do número de rosetas presente no controle e R_t a média do número de rosetas presentes nos soros-testes.

Figura 12. Representação esquemático do ensaio funcional com células COS-7.



As células COS-7 são transfectadas com o gene da DBP11 fusionado à proteína GFP. As células transfectadas são incubadas com o plasma dos indivíduos de interesse e eritrócitos humanos expressando o receptor DARC na superfície. Na presença de anticorpos inibitórios (BIAbs) da interação DARC (eritrócito)-DBP11 (superfície da célula COS-7) não há interação ligante-receptor, e na ausência de BIAbs são formadas estruturas chamadas de rosetas (direita). Essas estruturas são quantificadas para determinação da frequência de inibição como descrito no item acima (4.4).

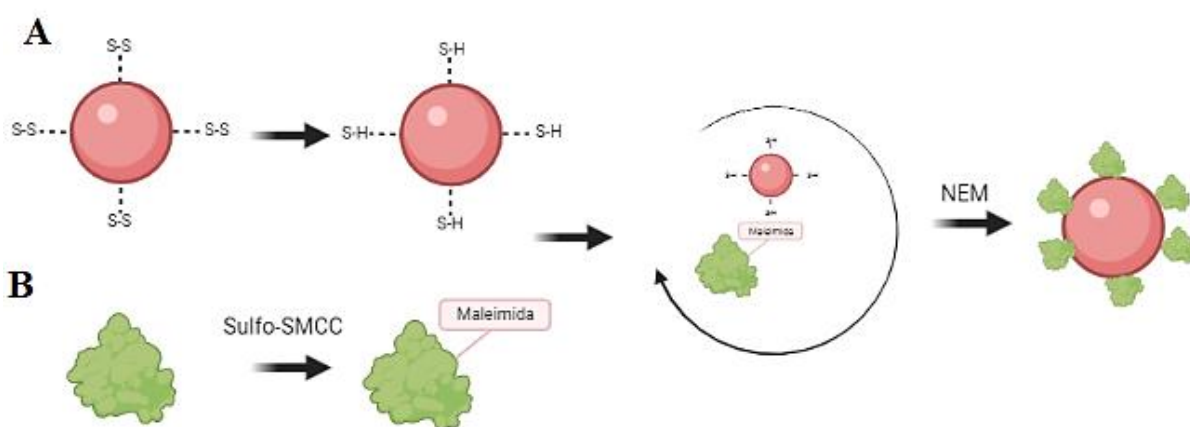
4.5 Ensaio com microesferas pela citometria de fluxo: *Multiplexed-microsphere-based flow cytometry assay*

A parte referente ao acoplamento das microesferas, bem como os ensaios de citometria de fluxo foram realizados em colaboração com Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do IRR/Fiocruz; mais especificamente, com a Dra. Andréa Teixeira Carvalho e Dra. Fernanda Fortes de Araújo.

4.5.1 Preparação das microesferas e acoplamento dos antígenos

As microesferas fluorescentes BD CBA Functional Bead (Becton Dickinson - Cat. No. 558556) selecionadas para o acoplamento (E4: DEKnull-2, C5: DBPII-Brz-1 e C7: DBPII Sal-1), foram tratadas com DTT, Dithiothreitol (Thermo Fisher), e incubadas com os antígenos de interesse previamente tratados com Sulfo-SMCC. Em seguida, as microesferas foram lavadas e ressuspensas em tampão de estocagem (Storage Buffer, Becton Dickinson) para atingirem uma concentração final de 6×10^6 microesferas/mL. Estas foram incubadas por 18 horas a 4°C . A figura 13 exemplifica o processo de ligação dos antígenos às microesferas selecionadas.

Figura 13. Representação esquemática do processo de acoplamento dos antígenos recombinantes às microesferas.



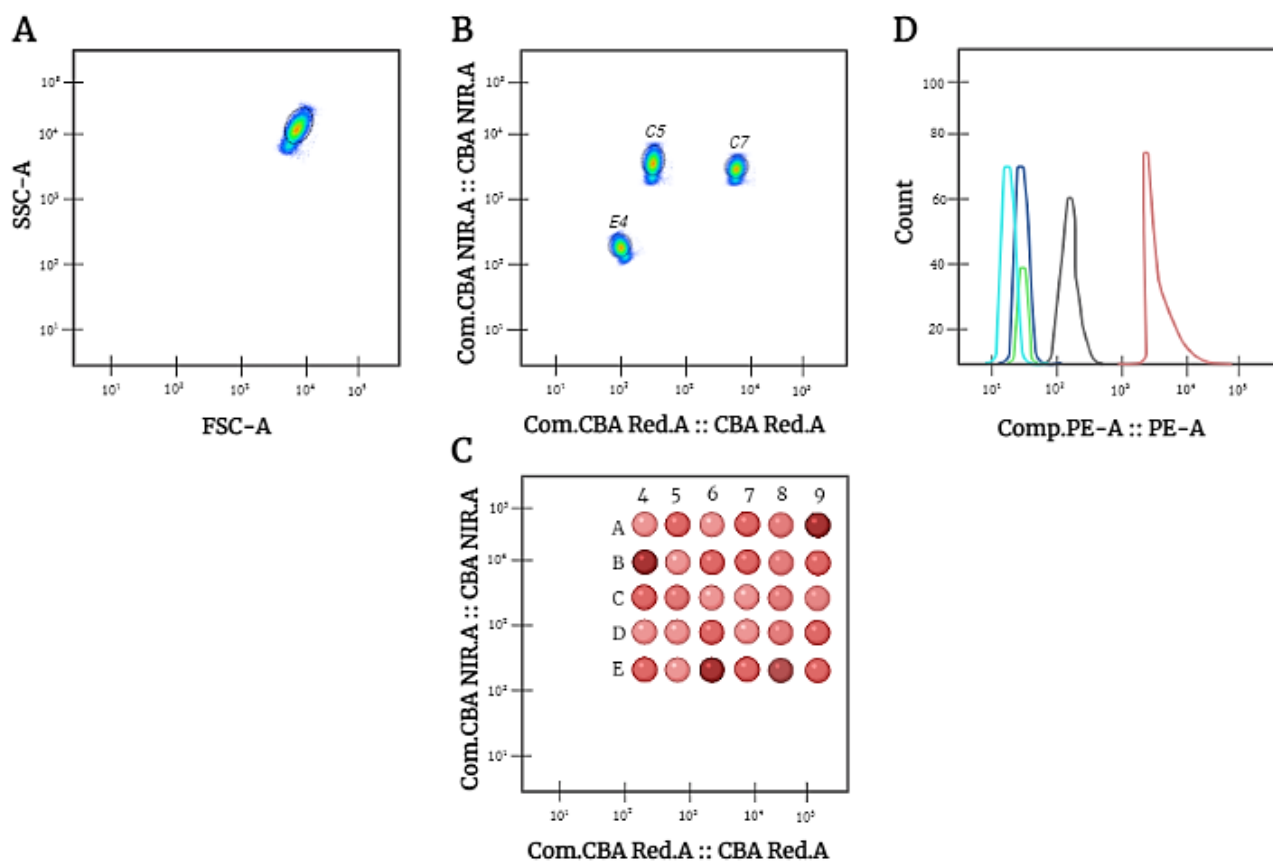
A) Preparação das microesferas com DTT, B) Preparação do antígeno com Sulfo-SMCC e interação entre antígeno-microesfera.

4.5.2 Ensaio sorológico multiplex

De posse dos antígenos acoplados, ensaios no formato simplex foram realizados para determinação das condições de anticorpo secundário e diluição de amostra a serem utilizados nos ensaios multiplex, com a finalidade de estabelecer as melhores condições para discriminação de amostras positivas e negativas. Para realização dos ensaios (simplex e multiplex), foi preparado uma solução contendo as microesferas acopladas aos antígenos, que foram distribuídas em placas de 96 poços (Falcon - Cat. No. 353077), e em seguida, foram incubadas com as amostras dos

pacientes. Posteriormente, as microesferas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com biotina: anti-IgG humano (Invitrogen – Cat. No. A18815), ou anti-IgM humano (Invitrogen – Cat. No. A18845) e Estreptavidina-Ficoeritrina, SAPE (Beckton Dickinson – Cat. No. 554061). Ao final, as microesferas foram lavadas e ressuspendidas em PBS contendo 0,5% BSA 0,1% azida sódica. Os controles internos da reação foram incluídos nos experimentos para monitorar a ligação não específica. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACSVerse (Becton Dickinson), onde foram adquiridos 500 eventos/antígeno, e as análises para avaliação da intensidade média de fluorescência (MFI) foram realizadas com a utilização do software FlowJo (Tree Stars) (Figura 14). Brevemente, as microesferas foram inicialmente selecionadas de acordo com suas características morfométricas forward scattering [FSC] and side scattering [SSC]). Posteriormente, os parâmetros CBA-NIR e CBA-Red foram selecionados para discriminar cada população de bead baseado no perfil fluorométrico de cada população. A intensidade média de fluorescência (MFI) foi determinada para cada população selecionando gráficos de histograma de Comp-PE, onde o eixo X representa a intensidade do anticorpo secundário. O valor exato de MFI foi determinado através da inclusão da estatística de MFI e Comp-PE.

Figura 14. Estratégia de análise para determinação da intensidade média de fluorescência no programa FlowJo.



(A) Estratégia de análise para discriminar a população de beads seguindo as características morfológicas selecionando FSC e SSC (forward scattering [FSC] and side scattering [SSC]), (B-C) Canais CBA-NIR e CBA-Red selecionado para discriminar as diferentes populações de beads de acordo com as características de tamanho e fluorescência de cada população. (D) A intensidade média de fluorescência (MFI) foi determinada para cada população e amostra selecionando o gráfico de histograma de PE-Comp onde no eixo X está discriminado a intensidade do anticorpo secundário. Os valores exatos de MFI foram obtidos adicionando a estatística de MFI e PE-Comp. Representação dos controles internos incluídos nos ensaios que incluem, bead não acoplada aos antígenos (azul claro); bead acoplada ao antígeno (azul escuro); bead acoplada a antígeno na ausência de amostra de plasma e na presença de reação secundária (verde). Controles adicionais incluíram um pool de amostras negativas (cinza), e positivas (rosa).

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism (Versão 5.03, San Diego, Califórnia, USA). Dependendo da distribuição dos dados amostrais, distribuição normal ou não, testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos foram utilizados, respectivamente. Assim, os testes de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis foram utilizados para comparar a diferença de médias/medianas entre os grupos, seguido de teste de Turkey ou Dunn como teste post hoc. O qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher foram utilizados para comparações de proporções entre os grupos. Para as análises de correlação foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman ou Pearson. Curvas do tipo ROC (*receiver operating curve*) e TG-ROC (*two-graphic receiver operating characteristic curves*) foram construídas para determinar os valores de *cut-off* e performance dos ensaios. A performance dos ensaios também foi determinada através de distintos parâmetros estatísticos, e definidos através de uma tabela de contingência 2x2 com intervalos de confiança de 95% (IC 95%), calculados através da calculadora estatística de código aberto *OpenEpi* (openepi.com, Versão 3). Foram calculados os seguintes índices de validação (i) sensibilidade = [verdadeiro positivo/(verdadeiro positivo + falso negativo)] x 100; (ii) especificidade = [verdadeiro negativo/(verdadeiro negativo + falso positivo)]. Onde as amostras que apresentaram anticorpos inibitórios no ensaio funcional de COS-7 foram consideradas verdadeiro positivas, e as que não apresentaram anticorpos inibitórios no ensaio funcional com células COS-7 foram consideradas como verdadeiro negativas. O modelo de regressão logística foi construído para descrever associações independentes entre a presença de anticorpos inibitórios (BIAbs) e a soropositividade no ensaio de citometria de fluxo. No modelo de regressão foram atribuídas as variáveis dependentes valores binários, onde as respostas positivas foram consideradas igual a “1” e as respostas negativas consideradas “0”.

5. Resultados

A apresentação dos resultados deste trabalho foi dividida em duas partes (desenho experimental, Figura 10). A primeira se refere ao estudo de uma plataforma multiplex pela citometria de fluxo para avaliar a resposta de anticorpos contra epítomos conservados (presente em diferentes variantes) e polimórficos (variante-específicos)

da DBPII. O objetivo dessa parte do trabalho foi identificar indivíduos que possam apresentar uma resposta de anticorpos capazes de bloquear a interação ligante (DBPII)-receptor DARC (BIAbs). A segunda parte está relacionada ao uso potencial da citometria de fluxo com proteínas altamente imunogênicas de *P. vivax* para identificar indivíduos infectados ou com história de infecção recente pelo *P. vivax*.

PARTE I – Plataforma multiplex para identificar indivíduos expostos ao *P. vivax* com anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor (DBPII-DARC)

Os resultados aqui apresentados foram publicados na revista *Frontiers in Immunology*, em um artigo intitulado “Multiplexed Microsphere-based Flow Cytometric Assay to Assess Strain Transcending Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II (DBPII) Reveals an Efficient Tool to Identify Binding-Inhibitory Antibodies (BIAbs) Responders” por Jéssica R S Alves, Fernanda F De Araújo, Camilla V Pires, Andréa Teixeira-Carvalho, Barbara A S Lima, Letícia M Torres, Francis B Ntumngia, John H Adams, Flora S Kano e Luzia H Carvalho. DOI: 10.3389/fimmu.2021.704653 (Apêndice 1).

5.1 Acoplamento das proteínas de *P. vivax* às microesferas e padronização dos ensaios de multiplex pela citometria de fluxo.

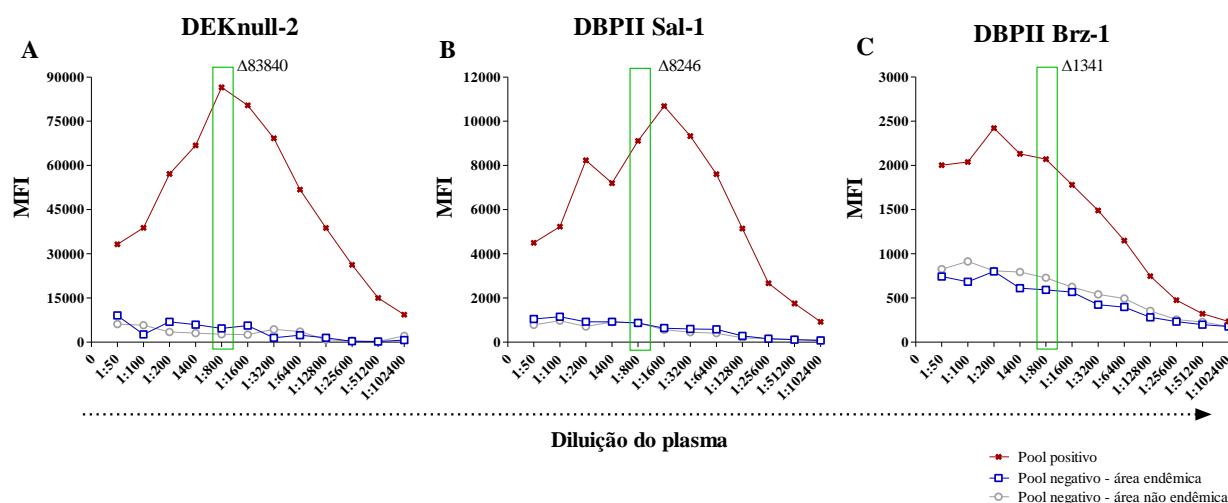
Para realização dos ensaios multiplex, foram inicialmente acopladas às microesferas as proteínas de interesse que incluem o protótipo vacinal DEKnull-2, a cepa referência de DBPII Sal-1, e DBPII Brz-1 que é uma variante predominante na região da Amazônia brasileira. O acoplamento foi realizado segundo as recomendações descritas pelo fabricante (item 4.5.1).

De posse dos complexos proteína-microesfera, pretendeu-se confirmar o acoplamento dos antígenos, bem como realizar curvas de titulação para determinar as melhores condições para realização dos ensaios. Para tal, foi necessário estabelecer as melhores condições com relação aos títulos de anticorpos das amostras plasmáticas, bem como do anticorpo secundário (conjugado de IgG comercial). Foram realizados experimentos de diluição seriada de “pools” de amostras previamente classificadas pela sorologia convencional como sabidamente positivas

(elevada reatividade no ELISA e com resposta inibitória positiva no ensaio funcional com células COS-7) e negativas, que incluiu amostras de indivíduos residentes em áreas endêmicas (controle negativo da área), bem como controles negativos de indivíduos nunca expostos à transmissão (controle negativo - área não endêmica).

Os ensaios de padronização foram realizados para cada antígeno individualmente (formato simplex). Cada *pool* de amostras (positivo e negativo) foi diluído serialmente a partir de 1:50 até 1:102.400, sendo o anticorpo secundário anti-IgG avaliado nas diluições de 1:500, 1:1000 (dados não mostrados) e 1:5000 (Figura 13). Para todos os antígenos foi possível observar diferença na intensidade média de fluorescência (MFI) entre o *pool* de amostras positivas e negativas, demonstrando que, o acoplamento foi realizado de forma adequada. Através dos cálculos dos valores de delta (diferença entre a intensidade da resposta de amostras positivas e negativas) foi escolhida a melhor diluição para realização dos ensaios multiplex. As condições escolhidas foram anti-IgG 1:5000 e amostras na diluição de 1:800, o que permitiu diferenciar positivos e negativos para todos os antígenos avaliados. A figura 15 ilustra o resultado da titulação, onde pode se observar a diferença na intensidade da resposta entre os pools positivos e negativos para todas as proteínas avaliadas. Vale a pena ressaltar os elevados níveis de fluorescência detectados para o protótipo DEKnull-2 (aproximadamente 90.000) quando comparado com aqueles detectados para as variantes nativas Sal-1 e Brz-1, cuja fluorescência máxima foi de cerca de 12.000.

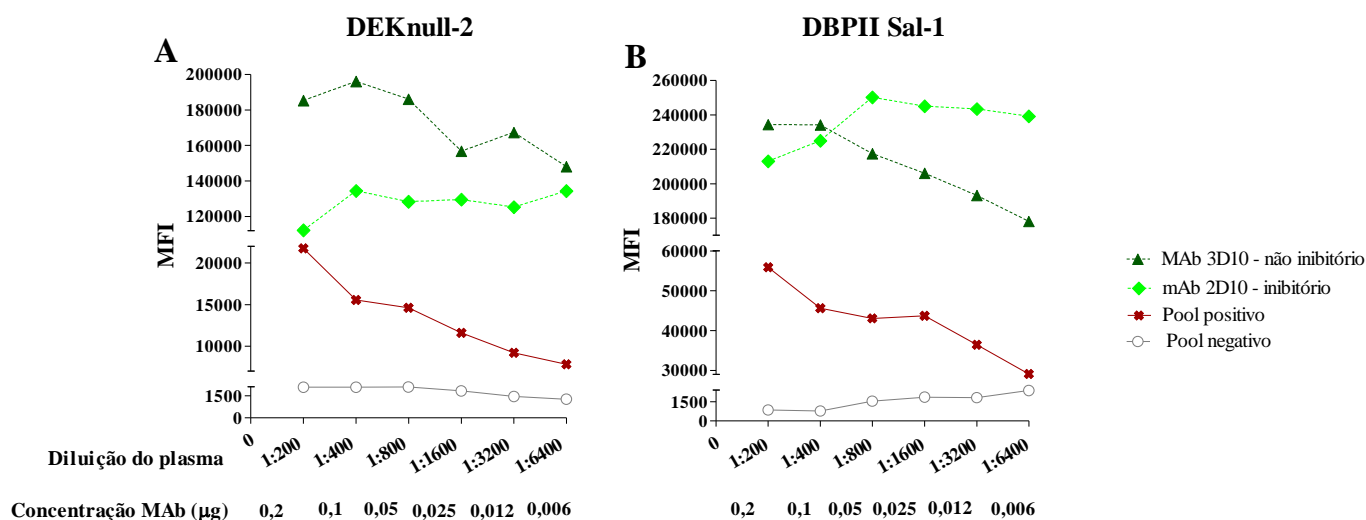
Figura 15. Experimentos de titulação realizados para padronização dos ensaios de citometria para os antígenos DEKnull-2 (A), DBPII Sal-1 (B) e DBPII Brz-1 (C).



Nos gráficos estão representados a intensidade média de fluorescência (MFI) dos diferentes pools de amostras positivas e negativas, para diluições variando de 1:50 a 1:102.400, nas condições em que o conjugado anti-IgG foi diluído para 1:5000. Em cinza estão representadas a MFI do pool de plasmas correspondendo a indivíduos negativos no ELISA e nunca expostos à malária [pool (-) não exposto], em azul os negativos ELISA e ensaio funcional com células COS-7, mas residentes em área endêmica [pool (-) exposto], e em vermelho o pool de amostras de indivíduos alto-respondedores no ELISA e com elevada resposta inibitória no ensaio funcional com células COS-7 (>90% inibição) [pool (+) exposto]. Os valores de delta (Δ) representados no gráfico correspondem a diferença da MFI do pool de amostras positivas [pool (+) exposto, vermelho] e negativas [pool (-) não exposto, cinza].

Com o objetivo de avaliar se o processo químico de acoplamento não estava interferindo na exposição de epítomos inibitórios, um ensaio de titulação utilizando anticorpos monoclonais (MAb) anti-DBPII foi realizado. Foram incluídos anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos inibitórios (MAb 2D10) e não inibitórios (MAb 3D10) da proteína. Como mostrado na figura 16, houve reatividade de ambos os anticorpos monoclonais, confirmando que o processo de acoplamento não alterou o reconhecimento de epítomos conformacionais alvos de anticorpos inibitórios.

Figura 16. Reconhecimento de epítomos específicos de DBPII (inibitórios e não-inibitórios) por anticorpos monoclonais (MAb).



Os gráficos acima representam a intensidade da resposta de anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos de anticorpos inibitórios (MAb 2D10 – verde claro) e não-inibitórios (MAb 3D10 – verde escuro). Em vermelho e cinza estão representadas a intensidade da resposta de *pools* positivos e negativos, respectivamente. As amostras de plasma foram diluídas serialmente de 1:200 a 1:6400. E a concentração dos anticorpos monoclonais no ensaio variou de 0,2 a 0,006µg.

5.2 Avaliação da resposta de anticorpos anti-DBPII em amostras de indivíduos naturalmente expostos aos *P. vivax*.

Uma vez determinada as melhores condições para realização do ensaio sorológico pela citometria, foi realizado um experimento inicial com painéis de amostras plasmáticas previamente caracterizado quanto ao perfil de reatividade a DBPII (Elisa e ensaio funcional com células COS-7). Especificamente, foram incluídos três subgrupos de reatividade: (i) alto respondedor (AR), n=14: tercil superior de resposta na sorologia convencional (IR entre 4-22, mediana 12,10) e BIAbs positivo (>90% inibição); (ii) não respondedor da área endêmica (NR), n=27: com amostras negativas pela sorologia convencional e BIAbs; e (iii) nunca expostos à malária (Não expostos), n=19: indivíduos residentes em áreas não endêmica de malária, e com amostras negativas pela sorologia convencional de ELISA.

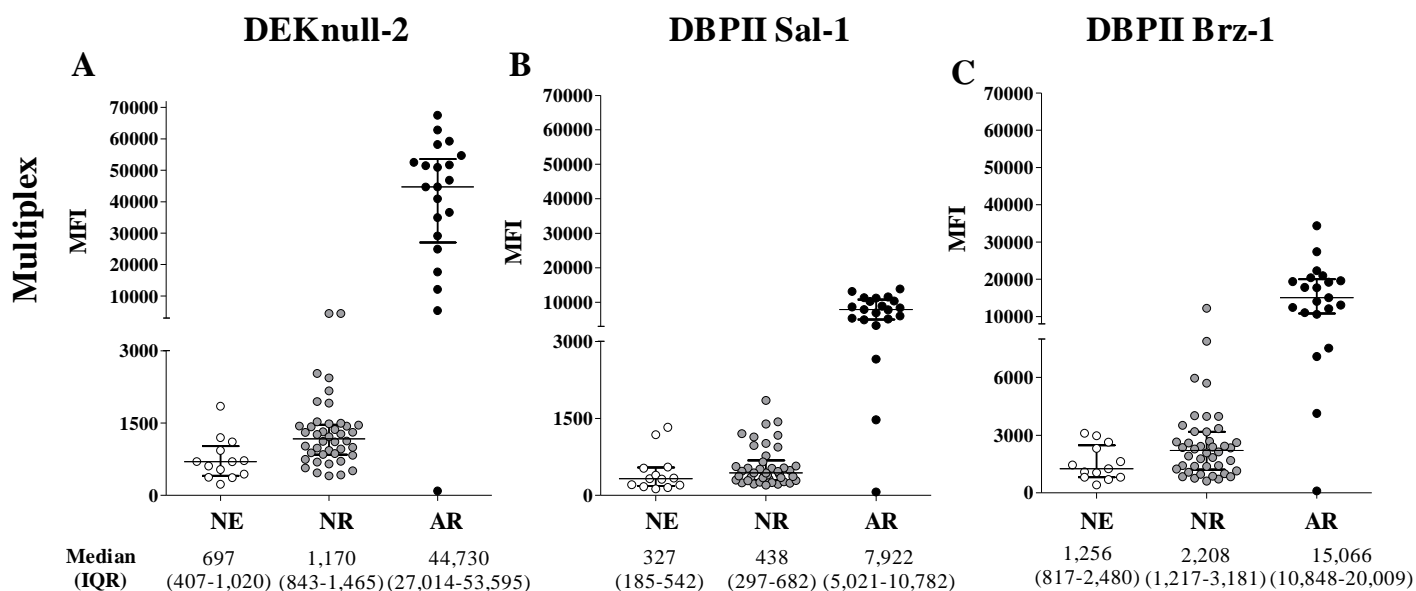
Os subgrupos de amostras bem caracterizadas (AR, NR e não exposto) foram submetidos ao ensaio sorológico pela citometria de fluxo e avaliados em ambos os formatos, isto é, simplex e multiplex (Tabela 2). A figura 17 representa o resultado do experimento realizado no formato multiplex. Pode-se observar uma diferença significativa na intensidade da resposta entre os grupos, particularmente, com a resposta do AR para a DEKnull-2 que chegou a ser 60 vezes maior quando comparado do grupo não respondedor. De relevância em ambos os formatos de ensaio (simplex e multiplex), a intensidade da resposta do grupo AR diferiu estatisticamente dos grupos não respondedores.

Tabela 2. Avaliação da resposta de anticorpos anti-DBPII pela citometria de fluxo em ensaio realizado no formato simplex e multiplex

Antígeno	Grupo	SIMPLEX MFI Mediana (IQR)	Razão SIMPLEX	MULTIPLEX MFI Mediana (IQR)	Razão MULTIPLEX	Correlação SIMPLEX x MULTIPLEX r (p value)
DEKnull-2	NE	1.520 (712-3.727)	AR/NE= 40	697 (407-1.020)	AR/NE= 64	0,74 (p <0.001)
	NR	3.341 (1.756-6.035)	AR/NR=18	1.170 (843-1.465)	AR/NR=38	
	AR	60.879 (48.586-81.795)		44.730 (27.014-53.595)		
DBPII Sai-1	NE	467 (275 – 1.545)	AR/NE= 8	327 (185-542)	AR/NE= 24	0,46 (p<0.001)
	NR	468 (347-1.103)	AR/NR=8	438 (296-682)	AR/NR=18	
	AR	3.698 (1.261-6.055)		7.922 (5.021-10.782)		
DBPII Brz-1	NE	280 (204-568)	AR/NE=9.7	1.256 (816-2.480)	AR/NE=12	0,34 (p=0.0034)
	NR	308 (251-542)	AR/NR=8.8	2.208 (1.217-3.181)	AR/NR=7	
	AR	2.719 (1.023-5.658)		15.066 (10.848-20.009)		

Resultados expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MFI), e a razão entre a resposta do grupo alto respondedor (AR) versus grupos não-respondedores (NR e NE) foram calculados para o formato simplex e multiplex. Análise correlação de Spearman foi realizada para avaliar a correlação entre os dados obtidos no ensaio simplex e multiplex.

Figura 17. Intensidade da resposta de anticorpos no ensaio sorológico multiplex para os antígenos DEKnull-2 (A), DBPII Sal-1 (B) e DBPII Brz-1 (C).

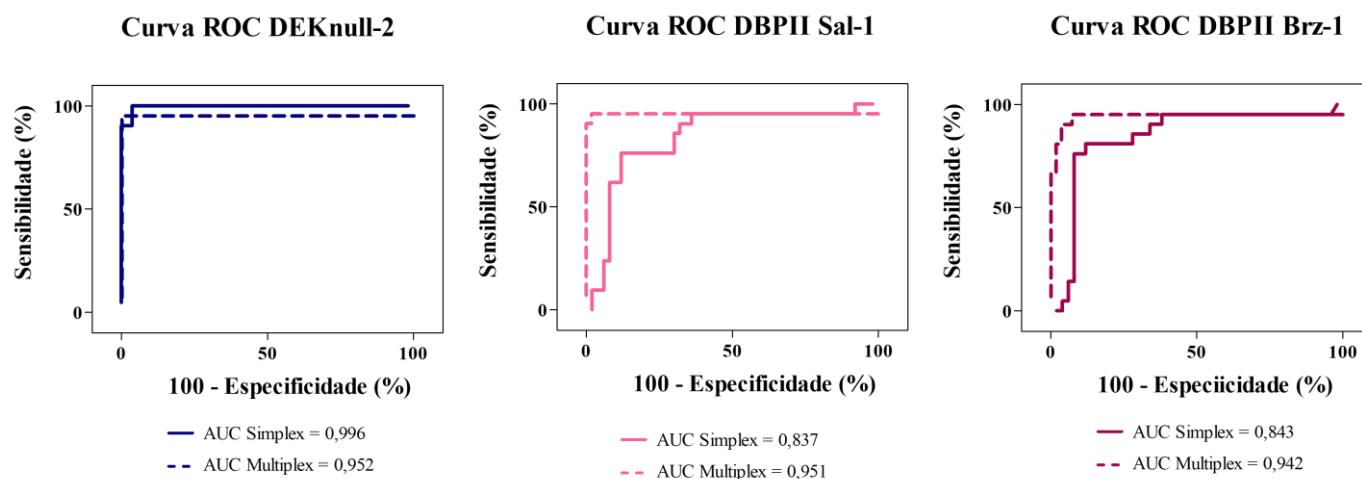


Os gráficos representam a intensidade da resposta (MFI) de anticorpos anti-DBPII em amostras de indivíduos residentes em área endêmica de malária (n=41), previamente caracterizados em ensaios sorológicos convencionais (ELISA e ensaio funcional) e classificados de acordo com a intensidade da resposta. AR – alto respondedor (preto): IR \geq tercil superior de resposta e frequência de resposta inibitória (BIAbs) \geq 90%. NR – não respondedor (cinza claro): IR \leq 1 e frequência de resposta inibitória \leq 50%. Amostras de indivíduos residentes em área não endêmica também foram incluídas (Naive, n=19 - branco), e apresentaram IR \leq 1 e frequência de resposta inibitória \leq 50%.

Análises de correlação de *Spearman* mostraram que os dados obtidos no ensaio em ambos os formatos foram correlacionados (P < 0,05 para todas as proteínas). Em conjunto, esses resultados demonstram que diferentes variantes alélicas de DBPII podem ser utilizadas no mesmo ensaio, potencializando a capacidade de avaliar anticorpos específicos contra esse antígeno.

Além disso, curvas ROC foram construídas com o resultado obtido em ambos os formatos de ensaio, para avaliar a capacidade de distinguir corretamente amostras positivas e negativas. Observa-se que, ambos os formatos apresentam uma elevada acurácia (AUC) sendo de >80% para o formato simplex, e >90% para o formato multiplex para todos os antígenos (Figura 18).

Figura 18. Avaliação da performance da plataforma sorológica pela citometria de fluxo.



Gráficos de curvas ROC (*Receiver Operating Curves*) comparando a performance do ensaio no formato simplex e multiplex para determinar a resposta de anticorpos contra DBPII. Para a análise, foram incluídas um painel de amostras negativas de indivíduos residentes em áreas endêmica (n=42) e não-endêmica (n=13), e também amostras positivas, de indivíduos residentes em área endêmica de malária (n=21).

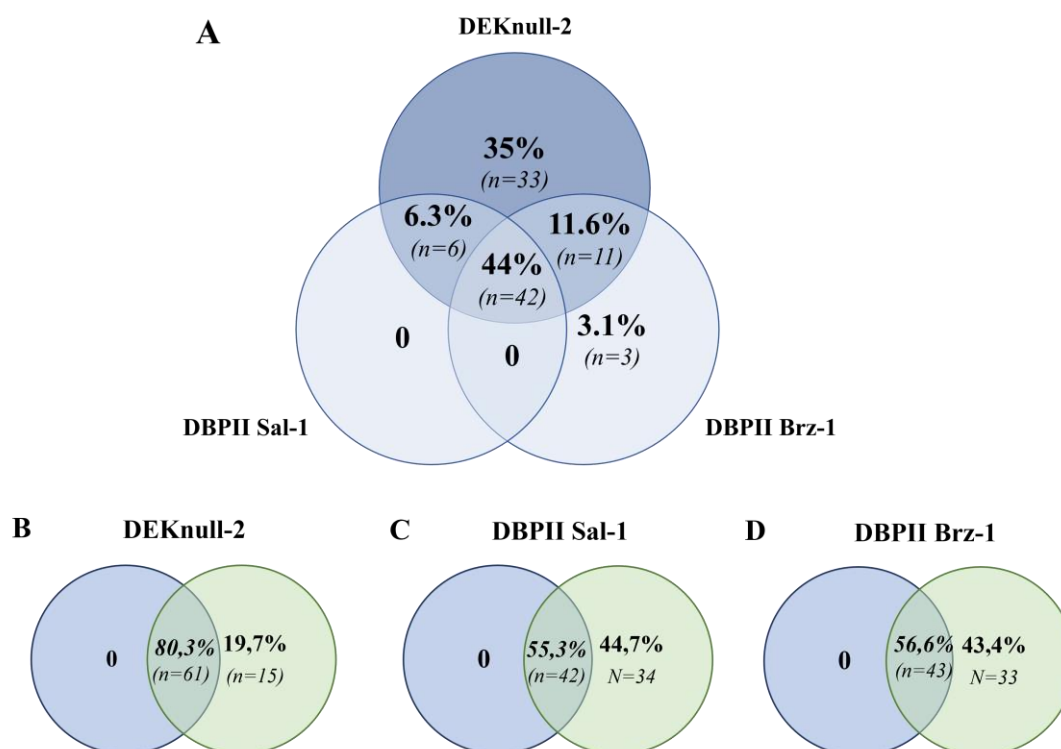
5.3 Amplitude da resposta de anticorpos detectados pela citometria de fluxo e a presença de anticorpos inibitórios (BIAbs).

Finalmente, buscamos avaliar se o ensaio multiplex poderia ser indicativos da presença de anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor (BIABs), como detectado pelos ensaios funcionais. Para tal, a resposta de anticorpos anti-DBPII foi avaliada em um painel de 245 amostras de plasma de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax*.

Do total de amostras avaliadas pelo ensaio multiplex de citometria de fluxo, 39% (95/245) foram positivas para pelo menos uma construção de DBPII incluída no ensaio. A Figura 19A ilustra em um diagrama de Venn as frequências de resposta para a DEKnull-2, Sal-1 e Brz-1. Entre as amostras positivas, 97% (92/95) foram para a DEKnull-2, das quais 35% (33/95) foram reativas exclusivamente para DEKnull-2. Ressalta-se que, 44% (42/95) apresentaram uma resposta de anticorpos de ampla reatividade para a DBPII, sendo positivas para todas as construções avaliadas no ensaio (Figura 19A).

Em paralelo, as amostras codificadas foram caracterizadas quanto a presença de anticorpos inibitórios pelo ensaio funcional utilizando células COS-7 como descrito no item 4.4. Os resultados demonstraram que 31% (76/245) das amostras apresentavam uma resposta de anticorpos inibitórios (dados não mostrados). A associação entre a presença de BIABs e a positividade no ensaio multiplex para cada construção de DBPII está representada na figura 19 B-D. No total 78% (61/76) das amostras com resposta inibitória foram positivas no ensaio multiplex pela citometria de fluxo (Figura 19 B-D), sendo que, para o protótipo DEKnull-2 foi observada uma maior frequência de positividade quando comparado as variantes nativas ($p < 0,05$, teste exato de Fisher).

Figura 19. Diagrama de Venn das amostras positivas no ensaio sorológico multiplex pela citometria de fluxo (n=95) e pelo ensaio funcional com células COS-7 expressando a DBPII (n=76).

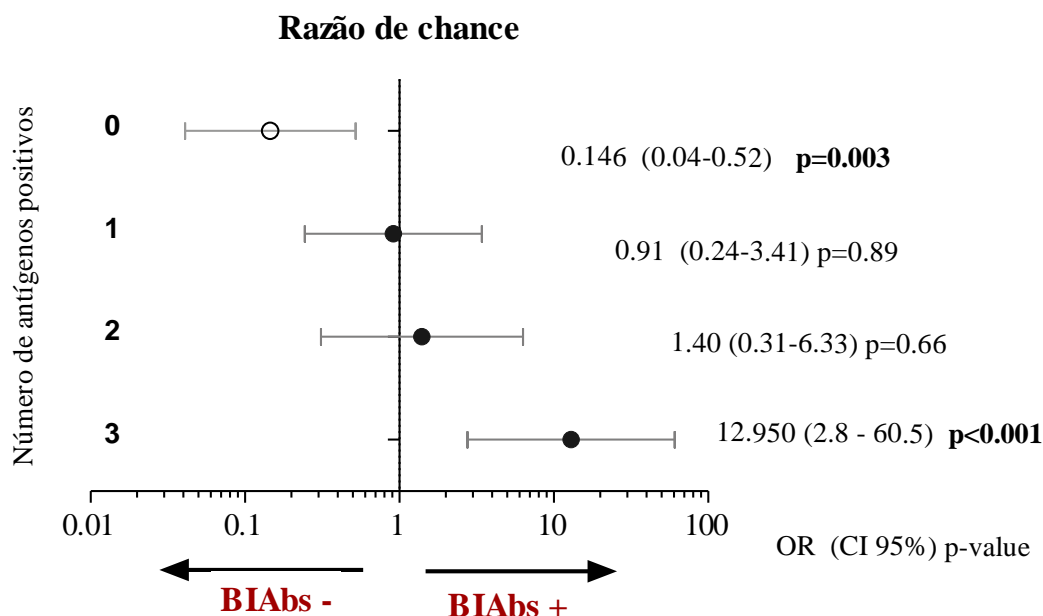


Em A está representada a relação entre todas as 95 amostras que foram positivas no ensaio sorológico multiplex pela citometria de fluxo para pelo menos uma das construções de DBPII. Em azul escuro está representado a frequência de amostras positivas apenas para o protótipo DEKnull-2 (resposta contra epítomos conservados), ou concomitantemente para as variantes DBPII Sal-1 e DBPII Brz-1 (resposta contra epítomos variáveis) que está representada em azul claro no diagrama. Os valores

correspondem ao número e a frequência de amostras positivas. Nos gráficos B, C e D estão representadas a relação entre a positividade no ensaio funcional (BIAbs n=76, verde), e a positividade no ensaio multiplex para cada uma das variantes de DBPII (azul).

Diante desses resultados, calculou-se a razão de chance (*odds-ratio*) de ter anticorpos inibitórios de acordo com o número de antígenos reconhecidos na citometria de fluxo (Figura 20). Os dados demonstram que indivíduos positivos para os 3 antígenos no ensaio multiplex podem ter até 12 vezes mais chance de apresentar uma resposta de anticorpos inibitórios, quando comparado aos indivíduos negativos na citometria (OR = 12.95, 95% CI = 2.76-60.59-, $p < 0.001$).

Figura 20. Associação entre a resposta de anticorpos no ensaio multiplex pela citometria de fluxo e a presença de anticorpos inibitórios (BIAbs) em indivíduos naturalmente expostos.



Análise de OddsRatio ajustada (aOR) para avaliar a associação da presença (círculos pretos) ou ausência (círculo branco) de anticorpos IgG anti-DBPII detectados pela citometria de fluxo, e a presença de anticorpos inibitórios (DBPII BIAbs). As amostras foram classificadas de acordo com o número de antígeno as quais elas foram positivas.

PARTE II – Ensaio sorológicos pela citometria de fluxo para detecção de infecção aguda e/ou recente por *P. vivax*

Para a padronização do ensaio de citometria de fluxo usando a proteína quimérica AMA1/MSP1-19 fez-se necessário inicialmente (i) validar este antígeno frente as proteínas originais (AMA-1 e MSP1-19) e (ii) conhecer a reatividade das amostras de estudo na sorologia convencional de ELISA.

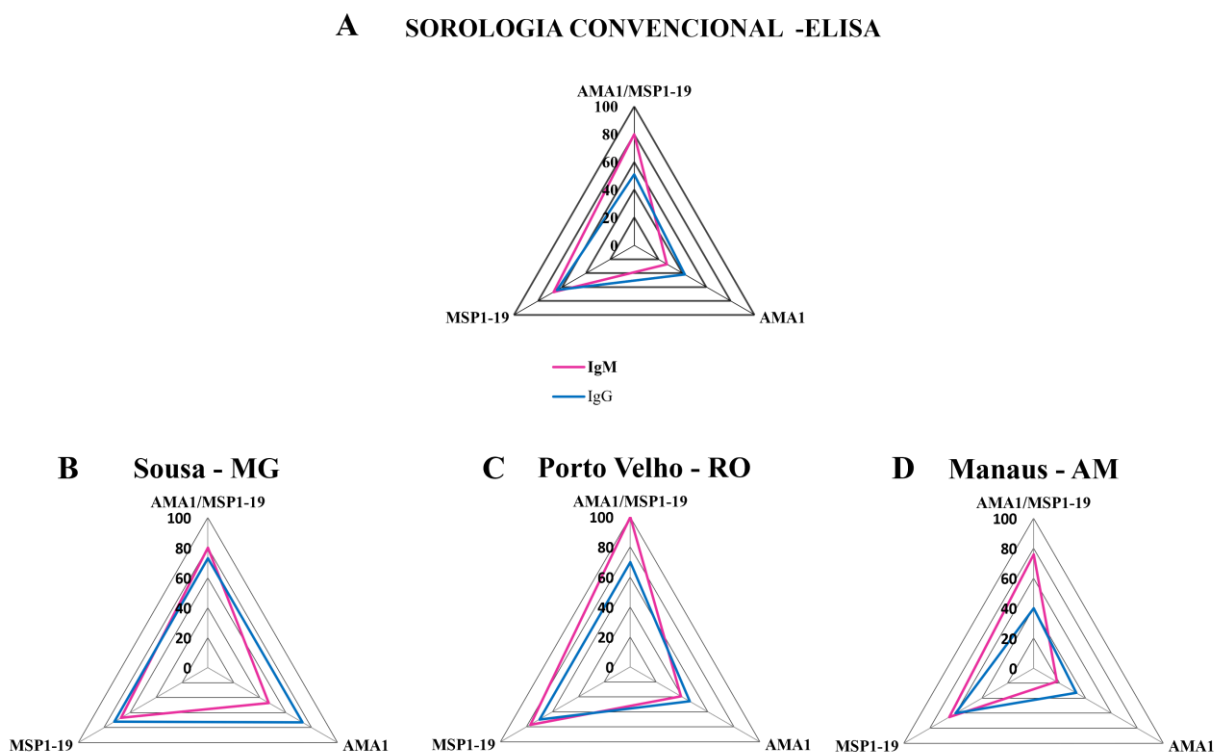
5.4 Resposta de anticorpos contra proteínas quimérica e não quiméricas de AMA1 e MSP1-19 pela sorologia convencional de ELISA em amostras de indivíduos primoinfectados com o *P. vivax*

Para cumprir o objetivo da segunda parte desse trabalho, que consiste em estabelecer um protocolo de sorologia pela citometria de fluxo para identificar indivíduos com infecção aguda ou recente pelo *P. vivax*, foram selecionados antígenos sanguíneos altamente imunogênicos. Os antígenos selecionados incluíram a proteína apical de membrana (AMA-1), a proteína de superfície do merozoíto (MSP1-19), e a combinação destes antígenos com o uso da proteína quimérica AMA-1/MSP1-19, recém desenvolvida pelo grupo de pesquisa da Dra. Irene Soares (USP). Para tal, foram incluídos apenas indivíduos primoinfectados, isto é, aqueles diagnosticados com infecção por *P. vivax* (microscopia) e sem histórico prévio de malária aguda, conforme descrito nos métodos (itens 4.1.2-4.1.3).

A figura 21 ilustra a frequência de resposta de anticorpos IgM e IgG para cada um dos antígenos testados. Como mostrado na Figura 21A, aproximadamente 80% dos indivíduos avaliados (n=85) apresentaram resposta de anticorpos IgM tanto para a proteína quimérica (vértice superior da Figura 21A) tanto para a MSP1-19 (inferior esquerdo). A proteína AMA-1 foi menos imunogênica, com uma frequência de indivíduos positivos de apenas 27% ($p < 0,0001$, teste exato de Fisher). Com relação a resposta de anticorpos IgG, a frequência de respondedores variou de 42 a 64%, sendo a AMA-1 o antígeno menos reconhecido (AMA-1 vs. MSP1-19; $p = 0,005$, teste exato de Fisher) (Figura 21A). Os resultados demonstram ainda que, para a proteína quimérica, a resposta de IgM foi mais prevalente que a resposta de IgG ($P < 0,0001$, teste exato de Fisher), entretanto, para os antígenos individuais não houve diferença na prevalência da resposta de IgM e IgG ($p > 0,05$, teste exato de Fisher).

Considerando o local de origem da primoinfecção (Sousa, Porto Velho ou Manaus), observou-se variabilidade de resposta entre as diferentes áreas de estudo, particularmente, na resposta de IgG contra a AMA-1 (Figura 21 B-D). De fato, a resposta de anticorpos IgG anti-AMA-1 foi significativamente mais prevalente em Sousa (47%) quando comparada as amostras de Manaus ($p=0,035$, teste exato de Fisher). Por outro lado, anticorpos IgM anti-proteína quimérica foram altamente prevalentes em todas as regiões estudadas, particularmente, em Porto Velho, onde a frequência de respondedores foi de 100% (Figura 21C). A frequência de resposta de anticorpos IgM anti-MSP1 também foi similar entre as áreas estudadas ($p=0,633$, Qui quadrado). Em conjunto, os resultados demonstram que a proteína quimérica apresentou resultados aparentemente superiores as proteínas usadas individualmente para identificar indivíduos primoinfectados por *P. vivax* de diferentes áreas (80-100% IgM positivos).

Figura 21. Frequência de indivíduos com primoinfecção pelo *P. vivax* que responderam pela sorologia convencional de ELISA a proteína quimérica AMA1/MSP1-19, e seus respectivos antígenos individuais, MSP1-19 e AMA-1.



Um total de 85 plasmas de indivíduos primoinfectados pelo *P. vivax* foram avaliados no ELISA. Em A, a frequência total de positivos por antígeno testado; Em B-D, as frequências de respondedores por área estudada, incluindo (B) Sousa (MG), na região extra-amazônica, n=15, (C) Porto Velho-RO, n=13 e (D) Manaus-AM, na Amazônia, n=57. Em rosa, a frequência de respondedores para anticorpos IgM e em azul para IgG.

Análises de correlação demonstraram ainda que, os resultados obtidos com a proteína quimérica AMA-1/MSP1-19 se correlacionaram positivamente com as proteínas individuais AMA-1 e MSP1-19 ($p < 0,0001$, Spearman), sendo os maiores coeficientes de correlação obtidos para a resposta de anticorpos entre antígenos AMA-1/MSP1-19 e MSP1-19 ($r = 0,9051$ para a resposta de IgM e $r = 0,6421$ para a resposta de IgG, $p < 0,0001$).

5.5 Acoplamento das proteínas quimérica e não quiméricas de *P. vivax* às microesferas e padronização do ensaio de citometria de fluxo

Para realização do ensaio sorológico pela citometria de fluxo, a proteína quimérica, bem como os antígenos individuais que compõe a proteína quimérica (AMA1 e MSP1-19), foram acoplados às microesferas segundo recomendações descritas pelo fabricante (item 4.5.1).

De posse dos complexos antígeno-microesfera, foram realizados ensaios de titulação afim de confirmar o acoplamento dos antígenos, bem como determinar as melhores condições para realização do ensaio, em relação à diluição da amostra e anticorpos secundários anti-IgM e IgG humanos. Para tal, foram realizados experimentos de diluição seriada de “pools” de amostras previamente classificadas como positivas (alta e baixa reatividade) e negativas pela sorologia de ELISA. Assim, foram incluídos 4 grupos de pools com diferentes níveis de reatividade para anticorpos IgM e IgG. Cada pool constituído de amostras plasmáticas de 6 indivíduos como a seguir: (i) indivíduos nunca expostos ao *P. vivax* e não reativos no ELISA (*grupo não exposto*); (ii) indivíduos com baixa reatividade no ELISA (*IR baixo*, entre 1 a 3); (iii) reatividade intermediária (*IR médio*, entre 4 a 8) (iv) alta reatividade (*IR alto*, $IR > 8$). Para o antígeno AMA-1 não foi possível identificar um pool de alta reatividade, portanto, apenas os pools de baixa e média reatividade foram utilizados nos experimentos.

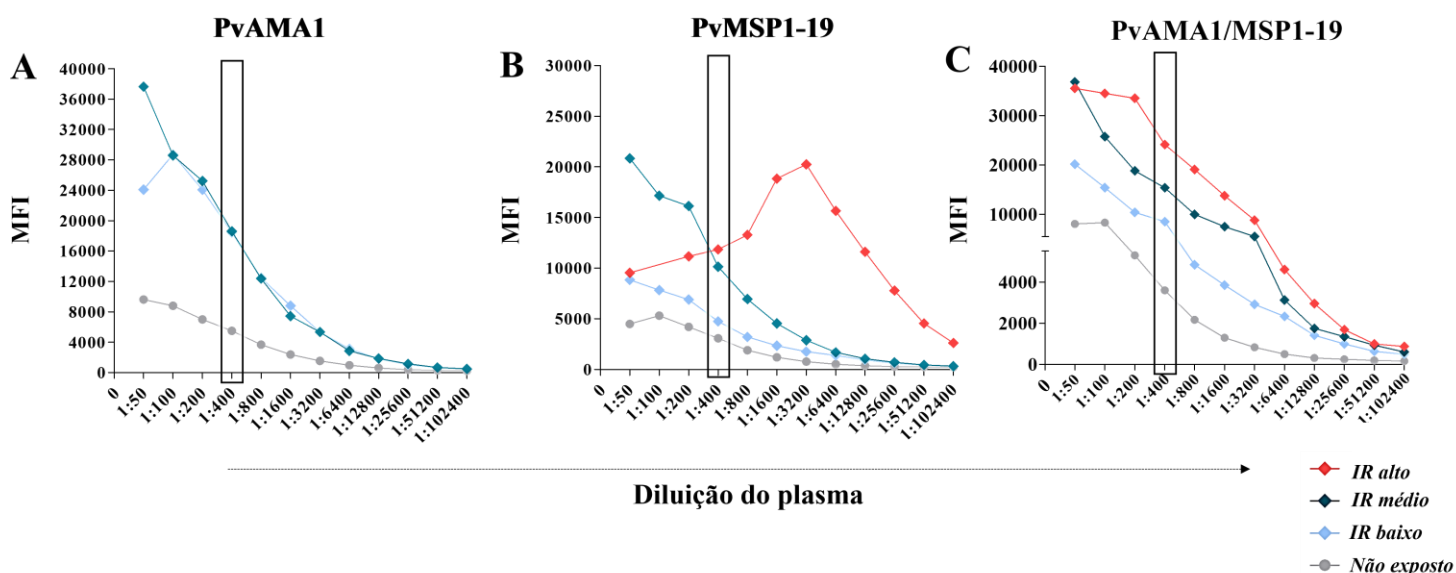
Cada pool de amostras (positivo e negativo) foi diluído serialmente a partir de 1:50 até 1:102.400, sendo o anticorpo secundário anti-IgM (Invitrogen – Cat. No. A18845) avaliado nas diluições 1:2500 e 1:5000 (dados não mostrados) e anti-IgG avaliado nas diluições 1:5000 e 1:10000 (dados não mostrados). A figura 22 apresenta o resultado da titulação dos pools nas condições de conjugado anti-IgM 1:2500. Para todos os antígenos estudados, os resultados confirmaram diferença nas reatividades do pool de amostras negativas e positivas; além disso, a intensidade da resposta dos pools positivos (MFI) confirmou à classificação prévia do ensaio de ELISA (*IR alto > médio > baixo*).

Através dos cálculos dos valores de delta (diferença entre a intensidade da resposta de amostras positivas e negativas) foram determinadas as melhores condições para realização dos ensaios multiplex. As condições escolhidas para a

realização dos ensaios foram anti-IgM 1:2500 e amostras na diluição de 1:400. Nesta diluição, os valores de delta para AMA-1 de 12.958 e 13.119 para os pools baixo e médio, respectivamente. Para MSP1-19, os valores de delta foram de 1.680, 7.061 e 8.767 para os pools baixo, médio e alto, respectivamente. E para a proteína quimérica os valores de delta foram de 4.938, 11.776 e 20.526 para os pools baixo, médio e alto, respectivamente.

Figura 22. Experimentos de titulação realizados para padronização do ensaio sorológico de citometria de fluxo para determinar a resposta de anticorpos IgM específico para as proteínas quimérica e não quiméricas de *Plasmodium vivax*.

Anti IgM-humano
1:2500

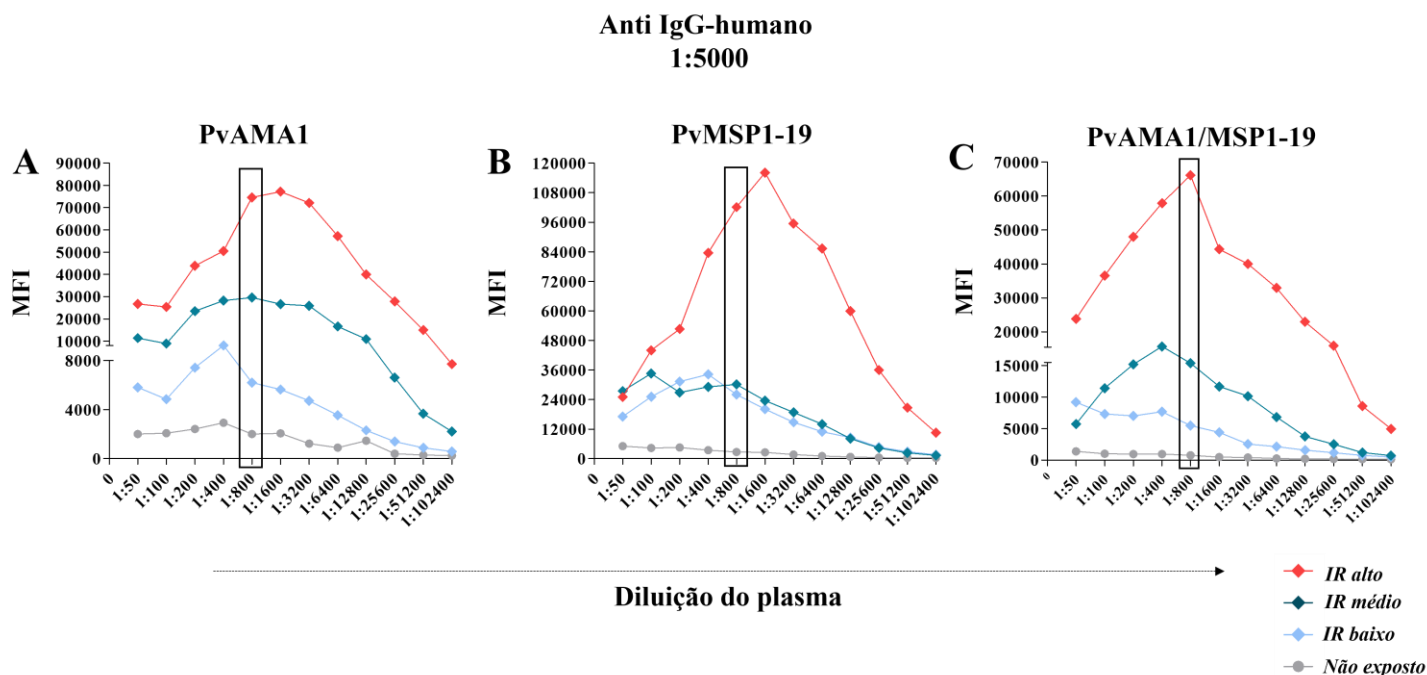


Nos gráficos estão representados a intensidade média de fluorescência (MFI) dos diferentes pools de amostras positivas e negativas, para diluições variando de 1:50 a 1:102.400, nas condições em que o conjugado anti-IgM foi utilizado na diluição de 1:2500. Em cinza estão representadas a MFI do pool de plasmas correspondendo a indivíduos negativos no ELISA e nunca expostos à malária (pool negativo não exposto), em azul claro o pool de amostras positivas pelo ELISA e classificadas como baixo reativas (IR Baixo, >1 IR <3), em azul escuro o pool de amostras classificadas como médio reativas (IR Médio, >4 IR <8), e em vermelho o pool de amostras classificadas como alto reativas (IR Alto, IR >8). O retângulo representa a diluição da amostra escolhida para realização do ensaio baseado nos valores de delta (Δ) que correspondem a diferença da MFI do pool de amostras positivas e negativas.

A resposta de anticorpos IgG também foi titulada e a figura 23 representa o resultado dos ensaios com o conjugado anti-IgG humano (Invitrogen – Cat. No. A18815) na diluição de 1:5000. Assim como observado para os anticorpos IgM, a

resposta de anticorpos IgG-antígeno específica também permitiu diferenciar pools de plasmas negativos e positivos, incluindo as diferenças nos níveis de reatividade dos pools positivos (IR alto > médio > baixo). As condições escolhidas para a realização dos ensaios foram anti-IgG 1:5000 e amostras na diluição de 1:800. Nessas condições os valores de delta para AMA-1 foram de, 4.199 para o pool baixo, 27.573 para o pool médio e 72.625 para o pool alto. Para MSP1-19 os valores de delta para o pool baixo foram de 23.359, 27.459 para o pool médio, e 99.481 para o pool alto. E para a proteína quimérica os valores de delta foram de 4.717 para o pool baixo, 14.608 para o pool médio e 65.371 para o pool alto.

Figura 23. Experimentos de titulação realizados para padronização do ensaio sorológico pela citometria de fluxo para determinar a resposta de anticorpos IgG contra as proteínas quimérica e não quiméricas de *Plasmodium vivax*.



Nos gráficos estão representados a intensidade média de fluorescência (MFI) dos diferentes pools de amostras positivas e negativas, para diluições variando de 1:50 a 1:102.400, nas condições em que o conjugado anti-IgG humano foi utilizado na diluição de 1:5000. Em cinza estão representadas a MFI do pool de plasmas correspondendo a indivíduos negativos no ELISA e nunca expostos à malária (pool negativo não exposto), em azul claro o pool de amostras positivas pelo ELISA e classificadas como baixo reativas (IR Baixo, >1 IR <3), em azul escuro o pool de amostras classificadas como médio reativas (IR Médio, >4 IR <8), e em vermelho o

pool de amostras classificadas como alto reativas (IR Alto, IR >8). O retângulo representa a diluição da amostra escolhida para realização do ensaio baseado nos valores de delta (Δ) que correspondem a diferença da MFI do pool de amostras positivas e negativas.

Em conjunto, esses dados demonstram que o ensaio sorológico pela citometria de fluxo foi capaz de discriminar amostras positivas e negativas para a resposta de anticorpos anti-IgM e anti-IgG contra os diferentes antígenos sanguíneos de *P. vivax*. Além disso, o ensaio aqui padronizado permitiu diferenciar pools de baixa reatividade dos negativos, com uma diferença de, no mínimo, duas vezes (como no caso da resposta de IgM anti-MSP1-19).

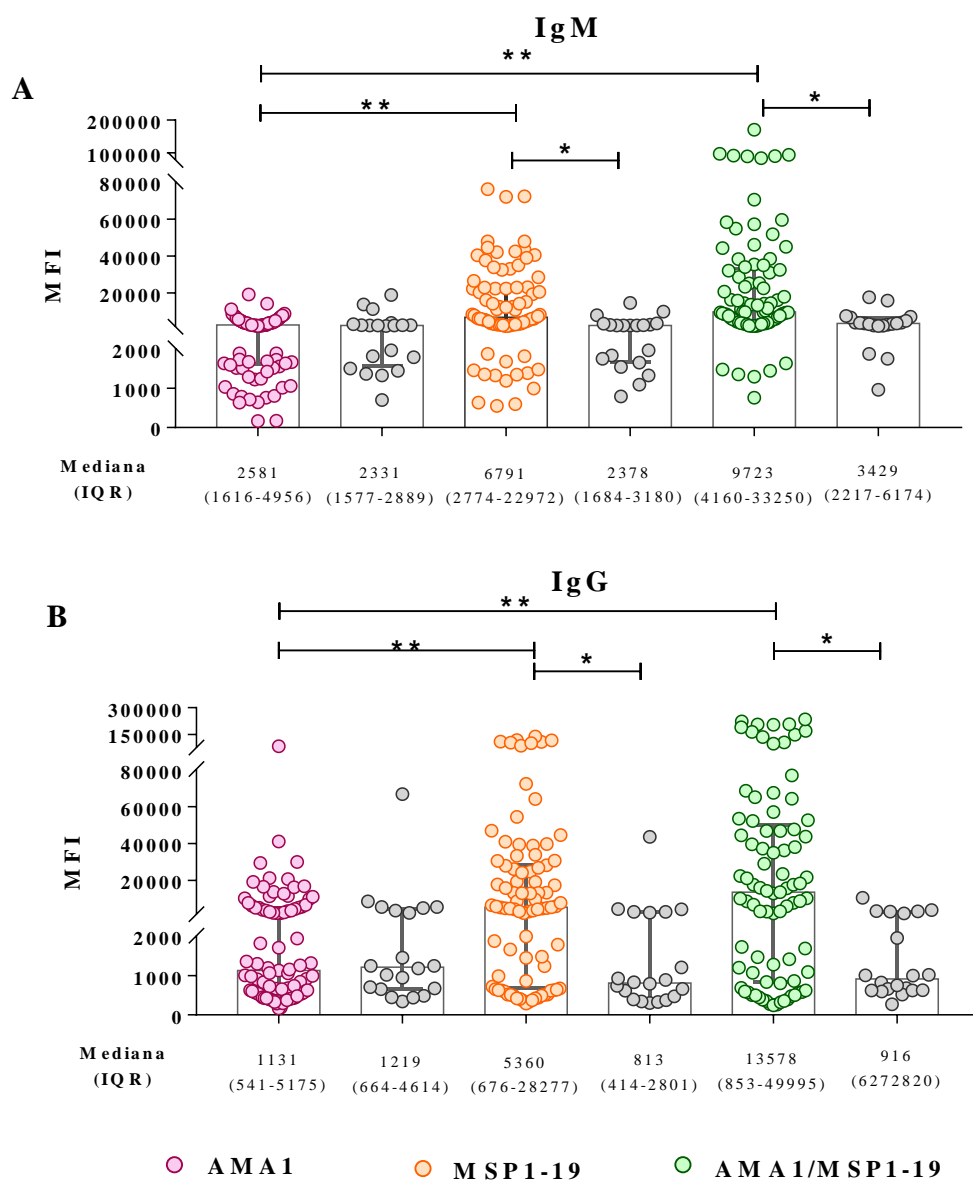
5.6 Performance da proteína quimérica AMA-1/MSP1-19 e das proteínas não quiméricas na citometria de fluxo para identificar indivíduos primoinfectados com o *P. vivax*

Uma vez padronizado o ensaio sorológico pela citometria de fluxo, as respostas de anticorpos IgM e IgG contra os antígenos de *P. vivax* foram avaliadas empregando-se um painel de amostras de indivíduos primoinfectados (n=85, item 4.1.3).

A figura 24 ilustra a intensidade média de fluorescência (MFI) das amostras dos 85 indivíduos primoinfectados para a resposta de IgM (Figura 24 A), ou IgG (Figura 24 B). Para AMA-1, não houve diferença significativa na intensidade das respostas de anticorpos IgM ou IgG entre os grupos de primoinfectados (roxo) e não exposto (cinza). Em contrapartida, houve uma diferença significativa na intensidade da resposta de anticorpos IgM para o antígeno MSP1-19 ($p=0,002$, teste de Mann-Whitney), que chegou a ser aproximadamente três vezes maior no grupo primoinfectados (laranja) quando comparado ao grupo controle não reativo. De forma semelhante, houve diferença para a resposta de IgG contra esse antígeno ($p=0,0005$, teste de Mann-Whitney), com uma diferença de seis vezes na intensidade da resposta entre os grupos. A resposta de anticorpos para a proteína quimérica nas amostras dos indivíduos primoinfectados (verde) foi estatisticamente superior quando comparado ao grupo controle negativo tanto para a resposta de IgM ($p<0,001$, teste de Mann-Whitney), quanto para a resposta de IgG ($p=0,0013$, teste de Mann-Whitney). Além disso, a intensidade da resposta de AMA-1 foi inferior quando comparado à MSP1-19, e a proteína quimérica ($p<0,001$, teste de Mann-Whitney) no grupo de

indivíduos primoinfectados para a resposta de anticorpos IgM e IgG. Em contrapartida, diferenças não foram observadas quando comparado a intensidade da resposta de anticorpos entre a proteína MSP1-19 e a proteína quimérica no mesmo grupo de amostras (quimérica ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney)).

Figura 24. Intensidade da resposta de anticorpos IgM e IgG detectado no ensaio sorológico pela citometria contra os diferentes antígenos sanguíneos de *P. vivax*.

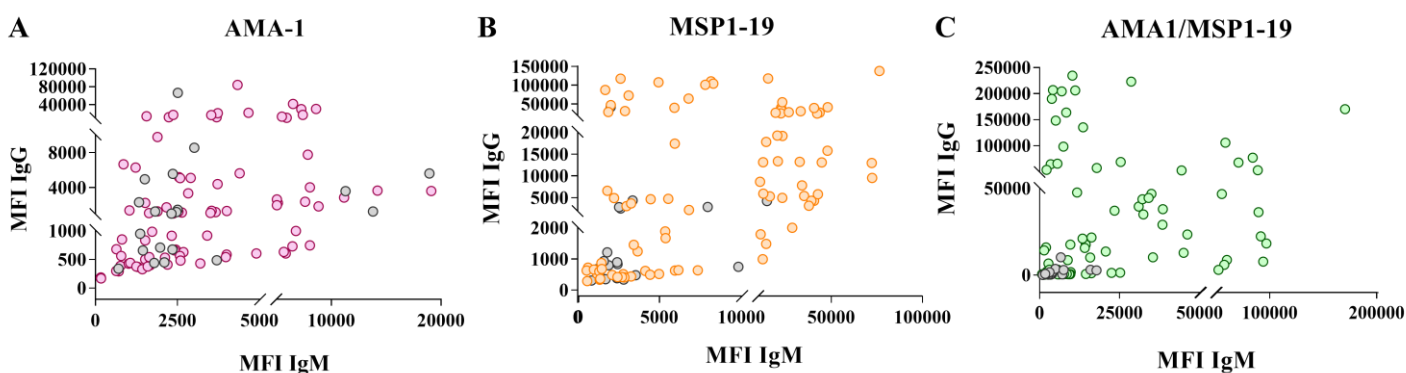


Em A está representada a intensidade da resposta de anticorpos IgM, e em B a intensidade da resposta de anticorpos IgG em amostras de indivíduos primoinfectados ($n=85$), bem como de indivíduos nunca expostos à malária, residentes em área não endêmica ($n=20$). Os gráficos ilustram a intensidade média de fluorescência (MFI) de cada um dos 105 indivíduos estudados. Na parte inferior do gráfico estão representados os valores de mediana e intervalo interquartil (IQR) para cada um dos antígenos no grupo de amostras de indivíduos primoinfectados sendo a resposta para AMA-1 representada em roxo, MSP1-19 em laranja, e a resposta para a proteína quimérica representada em verde. O grupo de indivíduos controle está representado

em cinza. A barra transversal acima dos gráficos de barra representa diferenças estatisticamente significativa entre positivos e negativos (* $p < 0.005$, e ** $p < 0,001$).

Em geral, as respostas de anticorpos IgM não se correlacionaram com anticorpos IgG (Figura 25), sendo este resultado independente do antígeno estudado ($p > 0,05$ para todas as correlações). Entretanto, vale ressaltar que, os resultados do ensaio com a proteína quimérica mostram que 100% das amostras dos controles negativos (bolinhas em cinza nos gráficos da Figura 25) apresentaram baixa reatividade tanto para a resposta de IgM quanto de anticorpos IgG. O pior desempenho foi para a AMA-1 com muitas amostras de indivíduos negativos apresentado elevada reatividade inespecífica.

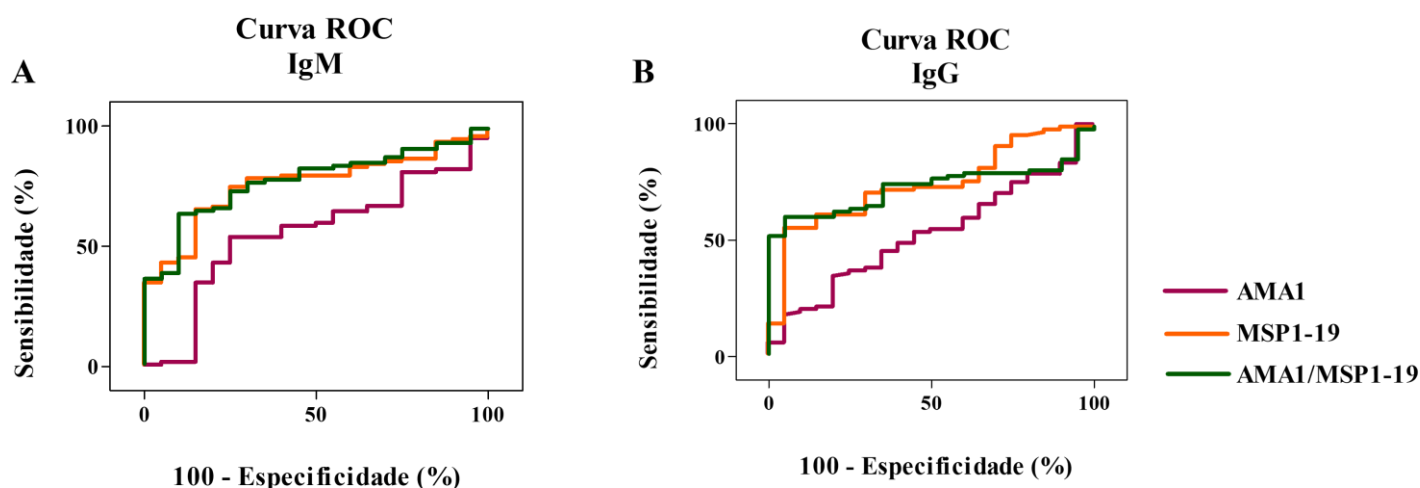
Figura 25. Ausência de correlação entre as respostas de anticorpos IgM e IgG pela citometria de fluxo para os antígenos AMA-1 (A), MSP1-19 (B) e proteína quimérica AMA1/MSP1-19 (C).



Nos gráficos, a intensidade da resposta das amostras dos indivíduos primoinfectados está representada em roxo para AMA-1, laranja para MSP1-19 e verde para AMA1/MSP1-19. Em cinza está representado a reatividade das amostras dos indivíduos controles, nunca expostos à malária. Para as análises de correlação foram consideradas todas as amostras avaliadas ($n=105$). A correlação foi avaliada usando o teste de correlação de Pearson, considerando um nível de 5% de significância.

Em seguida, buscou-se calcular a acurácia (análises de curvas ROC) de cada um dos antígenos na determinação das respostas de anticorpos IgM e IgG (Figura 26). Pode-se observar uma superioridade na performance dos antígenos MSP1-19 (AUC IgM=0,762 e AUC IgG=0,737) e proteína quimérica (AUC IgM=0,772 e AUC IgG=0,728) quando comparado à AMA-1 (AUC IgM= 0,555, e AUC IgG=0,515) tanto para a resposta de IgM (Figura 26 A), quando para a resposta de IgG (Figura 26 B).

Figura 26. Análises de performance do ensaio sorológico multiplex na determinação da resposta de anticorpos IgM e IgG contra antígenos sanguíneos de *P. vivax*.



(A) Curva ROC (ROC, *Receiver operating curve*) para determinação da acurácia (AUC, *area under the curve*) na determinação da resposta de anticorpos IgM para os antígenos AMA-1 (roxo), MSP1-19 (laranja) e AMA1/MSP1-19 (verde) e (B) IgG. Para a construção das curvas foram consideradas as amostras dos indivíduos primoinfectados (n=85, pacientes), e amostras de indivíduos nunca expostos à malária, residentes em área não-endêmica (n=20, controles).

A fim de determinar os valores de positividade do ensaio sorológico pela citometria de fluxo, curvas do tipo TG-ROC foram construídas para cada um dos antígenos, e os valores de cut-off foram determinados considerando uma especificidade de no mínimo 80% (Tabela 3). Menores valores de sensibilidade foram obtidos para AMA-1, variando de 43% para a resposta de IgM e 35% para a resposta de IgG. Apesar dos valores próximos de sensibilidade para os antígenos MSP1-19 e proteína quimérica (aproximadamente 60% para ambas), destaca-se a especificidade da proteína quimérica que chegou a 95% para a resposta de anticorpos IgG. Ressalta-se que, levando em consideração a positividade para a proteína quimérica para a resposta de anticorpos IgM ou IgG há um aumento na sensibilidade, que chega a 76% (IC95% 66.43 a 84.22), e especificidade de 80% (IC95% 58.4 a 91.93).

Tabela 3. Indicadores de performance do ensaio sorológico pela citometria de fluxo.

Antígeno	IgM			IgG		
	Cut Off (MFI)	Sen (%) IC95%	Esp (%) IC95%	Cut Off (MFI)	Sen (%) IC95%	Esp (%) IC95%
AMA1	3106	43 (32,8 a 54,7)	80 (56,34 a 94,27)	647	35 (24,18 a 45,20)	80 (56,34 a 94,27)
MSP1-19	3582	66 (54,8 a 75,8)	85 (62,11 a 96,79)	2964	62 (49,99 a 71,56)	85 (62,11 a 96,79)
AMA1/MSP1-19	7557	64 (52,38 a 73,71)	90 (68,3 a 98,77)	4900	60 (48,8 a 70,48)	95 (75,13 a 99,87)

Performance do ensaio sorológico pela citometria de fluxo para determinação da resposta de anticorpos IgM e IgG contra os antígenos AMA-1, MSP-19 e proteína quimera AMA1/MSP1-19 de *Plasmodium vivax*. Valores de *cut-off* determinados pelas curvas TG-ROC e selecionados com base em uma especificidade fixada de no mínimo 80%.

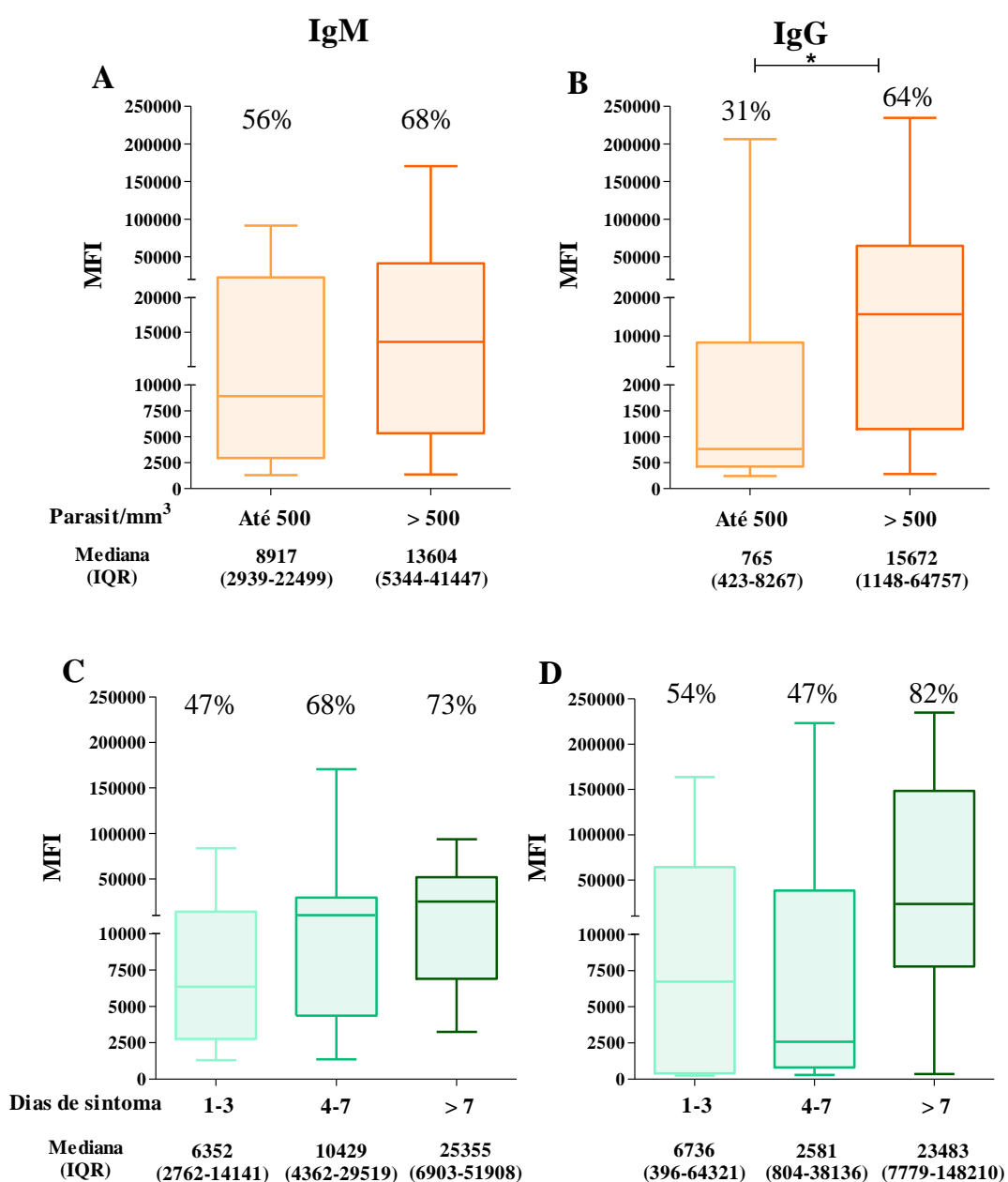
5.7 Positividade do ensaio de citometria de fluxo em função da parasitemia e do tempo de sintomas clínicos dos pacientes primoinfectados com *P. vivax*

Considerando que os resultados com a proteína quimérica foram promissores, fez-se necessário avaliar se a parasitemia do paciente poderia influenciar na positividade do ensaio de citometria de fluxo. Os resultados demonstram que a resposta de anticorpos IgG (mas não de IgM) foi influenciada pela parasitemia do indivíduo (Figura 27A); assim, em indivíduos com mais de 500 parasitos por mm³, os níveis de anticorpos IgG contra a proteína quimérica foram cerca de 7 vezes mais intensos que os níveis daqueles com parasitemias mais baixas.

Considerando que os indivíduos com mais tempo de sintomas clínicos de malária poderiam também apresentar níveis superiores de parasitemia, buscou-se em seguida associar a positividade na citometria de fluxo com o período relatado de sintomas pelo paciente. Como mostrado na Figura 27C embora a resposta de anticorpos IgM mostrou uma tendência de aumento (frequência e níveis) com o aumento do tempo de sintomas, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$, Dunn's teste). O mesmo perfil de resposta foi observado para

IgG, com frequência de positivos variando de 54-82%, e a intensidade da resposta de 6.736 a 23.483 MFI, mas sem significado estatístico ($p > 0,05$, Dunn's teste).

Figura 27. Intensidade da resposta de anticorpos IgM e IgG contra proteína quimérica de *P. vivax* em função da parasitemia e tempo com sintomas clínicos.



Os gráficos A e B representam a intensidade da resposta de anticorpos IgM (A) e IgG (B) contra a proteína quimérica AMA-1/MSP1-19 nos indivíduos classificados de acordo com a parasitemia. Na parte inferior estão representados a mediana e o intervalo interquartil dos grupos com parasitemia de até 500 paras/mm³ (n=16), e

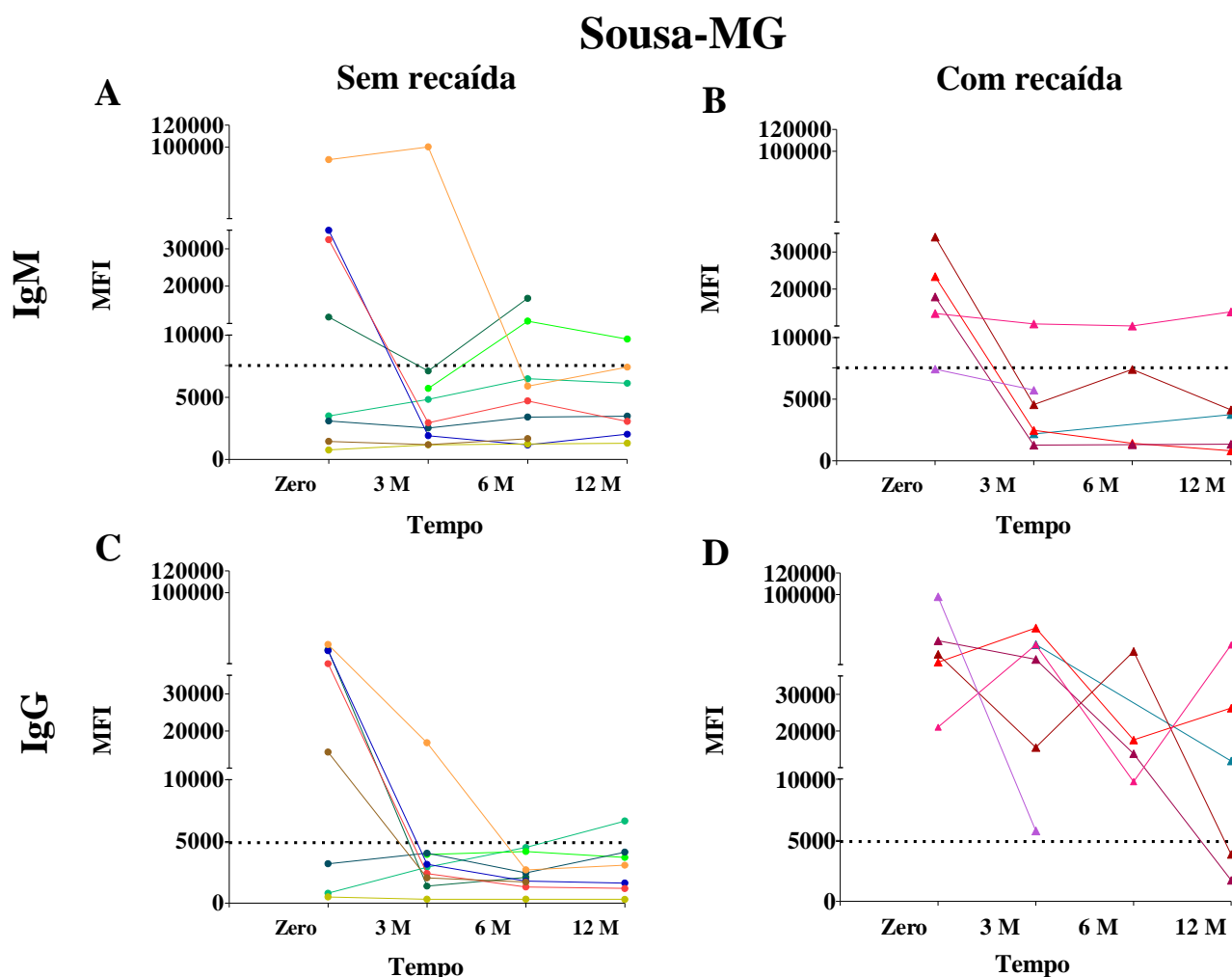
aqueles com parasitemia superior a 500paras/mm³ (n=53). Os gráficos C e D representam a resposta de anticorpos IgM (C) e IgG (D) dos indivíduos que foram classificados de acordo com o período de sintomas. Na parte inferior do gráfico estão representados os valores de mediana e intervalo interquartil dos grupos que relataram estar com sintomas nos períodos de 1-3 dias (n=15), 4-7 dias (n=38), e mais que 7 dias (n=11). Na parte superior estão representados a frequência de indivíduos positivos. A barra transversal acima dos gráficos de barra representa diferenças estatisticamente significativa (*p <0.005).

5.8 Cinética da resposta de anticorpos contra a proteína quimérica AMA1/MSP1-19 no ensaio de citometria de fluxo na primoinfecção pelo *P. vivax*

Com o objetivo de se avaliar a variação temporal da resposta de anticorpos IgM/IgG contra a proteína quimérica, foi realizado os ensaios sorológicos pela citometria de fluxo nas amostras de cinética dos pacientes primoinfectados pelo *P. vivax*, sejam eles de área não-endêmica (item 4.1.3), ou área endêmica (4.1.2).

No tempo zero, 57% dos indivíduos apresentaram uma resposta de anticorpos IgM, e 78,6% uma resposta de anticorpos IgG para a proteína quimérica. A cinética da resposta de anticorpos nas amostras dos indivíduos residentes em área não-endêmica de malária está representada na figura 26. No total, amostras de 14 indivíduos foram avaliadas e determinada a resposta de anticorpos IgM (Figura 28 A e B) e IgG (Figura 28 C e D) durante 12 meses pós-infecção. Para tal, os indivíduos foram estratificados de acordo com a ocorrência (n=5) ou não (n=9) de recaídas. Em relação a resposta de anticorpos IgM, observa-se que, independentemente da presença de recaídas, a resposta de anticorpos IgM tendeu a cair três meses após a infecção aguda (Figura 28 A-B). Considerando a resposta de anticorpos IgG, na ausência de recaídas, observa-se uma queda rápida na resposta de anticorpos três meses após a infecção inicial. De interesse, a ocorrência de recaídas permitiu um “booster” da resposta de anticorpos em todos os 5 indivíduos do grupo com recaída (Figura 28D).

Figura 28. Cinética da resposta de anticorpos IgM e IgG contra a proteína quimérica de *P. vivax* AMA1/MSP1-19 em amostras de indivíduos primoinfectados residentes em área não-endêmica de malária.



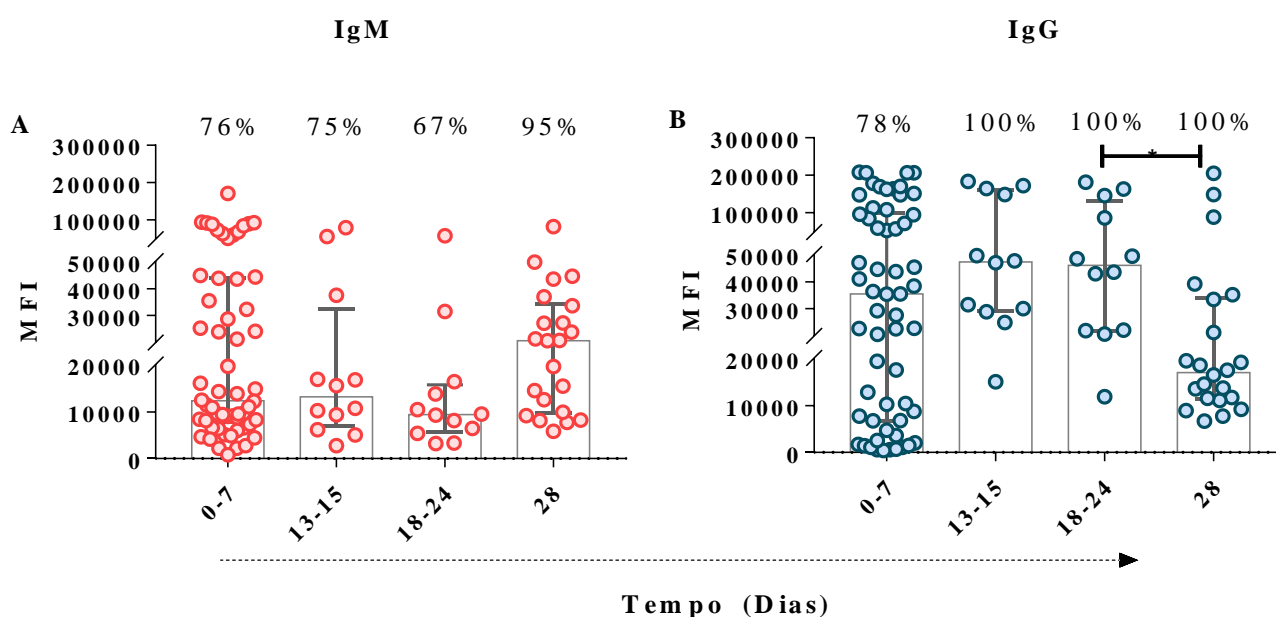
Intensidade da resposta de anticorpos (MFI) IgM (A e B) e IgG (C e D) contra a proteína AMA1/MSP1-19 em amostras de indivíduos primoinfectados residentes em Sousa-MG (n=14). Nos gráficos, cada indivíduo está representado por uma cor, e os grupos de indivíduos que tiveram não apresentaram recaída estão representados nos gráficos A e C, e a resposta de anticorpos dos indivíduos que tiveram recaída estão representados nos gráficos B e D. Cada indivíduo teve amostra de plasma coletada nos tempos zero, 3 meses (3M), 6 meses (6M), e 12 meses (12M) após o tempo zero. Para efeitos de positividade, os valores de *cut off* (linha tracejada) foram determinados baseados nas curvas TG-ROC (item 5.6).

A figura 29 representa a cinética da resposta de anticorpos IgM (Figura 29 A) e IgG (Figura 29 B) nas amostras dos indivíduos primoinfectados residentes em área

endêmica de malária. Pode se observar que os níveis de anticorpos IgM flutuaram ao longo do estudo, mas apesar disto não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de anticorpos durante os períodos avaliados.

Uma maior intensidade na resposta de anticorpos IgG foi observada nesse painel de amostras, principalmente até 24 dias após a admissão. Após esse período, podemos observar uma queda significativa na intensidade da resposta de anticorpos ($p=0,0024$, teste de Mann-Whitney), apesar da frequência de positividade se manter. Vale ressaltar que, a soma da reatividade de anticorpos IgM e IgG aumentou a frequência de positividade no período de 0-7 dias de 76% para 91,4%.

Figura 29. Cinética da resposta de anticorpos IgM e IgG contra a proteína quimérica em amostras de indivíduos primoinfectados residente em áreas endêmicas de malária (n=24).



Intensidade média de fluorescência (MFI) da resposta de anticorpos IgM (A) e IgG (B) em um painel de amostras de indivíduos primoinfectados. A barra transversal acima dos gráficos de barra representa diferenças estatisticamente significativa na intensidade da resposta (* $p < 0.005$).

Tabela 4: Intensidade da resposta (MFI) de anticorpos IgM e IgG contra a proteína quimérica em amostras de cinética de indivíduos primoinfectados admitidos em Manaus e Porto Velho.

Tempo	IgM		IgG		IgM ou IgG
	Mediana (IQR)	Positivo (%)	Mediana (IQR)	Positivo (%)	Positivo (%)
0-7	12.415 (7.946-43.971)	76	35.401 (6.787-98.713)	78	91,4
13-15	13.226 (6.979-32.345)	75	47.451 (29.099-160.678)	100	100
18-24	9.451 (5.689-15.850)	67	46.094 (21.753-130.755)	100	100
28	20.485 (9.762-34.383)	95	17.070 (11.453-33.788)	100	100

A intensidade da resposta de anticorpos contra a proteína quimérica foi avaliada em um painel de amostras de indivíduos primoinfectados coletadas em diferentes momentos desde a admissão do paciente no centro de referência em área endêmica de malária. No total, 70 amostras foram avaliadas. A positividade foi calculada baseada nos valores de cut-off determinados anteriormente com uma especificidade fixada de no mínimo 80%.

6. Discussão

PARTE I - Plataforma multiplex como ferramenta para triagem de indivíduos com anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC

O objetivo de se desenvolver vacinas baseadas na DBPII é estimular uma resposta de anticorpos que bloqueie a invasão dos merozoítos de *P. vivax* nos reticulócitos (DE et al., 2021; DRAPER et al., 2018). Estudos conduzidos em diferentes partes do mundo, incluindo o Brasil, já demonstraram que uma pequena parcela indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária desenvolvem uma resposta de anticorpos anti-DBPII de ampla reatividade (CHOOTONG et al., 2010; KING et al., 2008; MEDEIROS et al., 2020). Ademais, essa resposta naturalmente adquirida é capaz de inibir a invasão dos merozoítos nos reticulócitos (CHITNIS et al., 2007; NTUMNGIA et al., 2017), e a interação ligante-receptor entre DBPII e o DARC em ensaios celulares *in vitro*; sendo essa resposta inibitória (BIAbs) relacionada à proteção clínica (HE et al., 2019; KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016). Todos esses achados demonstram a importância de determinar não somente a presença de anticorpos contra a DBPII do *P. vivax*, mas também de caracterizá-los funcionalmente.

Embora a realização de ensaios funcionais *in vitro* sejam ferramentas importantes para direcionar o desenvolvimento de uma vacina, a avaliação de anticorpos inibitórios anti-DBPII em populações expostas à malária *vivax* ainda é restrita; contribui para isto à ausência de um sistema de cultivo contínuo *in vitro* das formas sanguíneas do *P. vivax* em reticulócitos jovens (ARMISTEAD; ADAMS, 2018; CHOTIVANICH et al., 2001).

Como alternativa do ensaio de invasão do parasito *in vitro*, diferentes plataformas de ensaios têm sido utilizadas para se determinar o bloqueio por anticorpos da interação ligante-receptor. Neste contexto, tem sido utilizado métodos baseados no antígeno DARC recombinante (SHAKRI; RIZVI; CHITNIS, 2012) ou em células transfectadas (COS-7) expressando a DBPII (MICHON; FRASER; ADAMS, 2000). No Brasil, nosso grupo de pesquisa é pioneiro no emprego de ensaios funcionais para estudar anticorpos anti-DBPII com atividade bloqueadora da interação DBPII-DARC (CERAVOLO et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2014). Contudo, essas metodologias apresentam limitações.

No ensaio funcional utilizando células COS-7 --protocolo de referência na avaliação da resposta inibitória (CHITNIS; MILLER, 1994) - os anticorpos são desafiados a inibir uma interação celular que envolve interações multivalentes (multímero-multímero), sendo assim, pequenas diferenças na atividade dos anticorpos podem não ser detectadas. Além de disto, o ensaio funcional utilizando células transfectadas é extremamente laborioso, o que dificulta sua utilização em estudos de base populacional com uma grande quantidade de amostras. De forma alternativa, ensaios sorológicos baseados na interação multímero-dímero, onde uma proteína recombinante DBPII interage com receptor DARC recombinante (DARC-Fc recombinante), tem sido propostos. Embora esse ensaio permite avaliar maior número de amostras, o mesmo envolve interações de baixa valência, o que pode superestimar a atividade inibitória (SAMPATH et al., 2013; SHAKRI; RIZVI; CHITNIS, 2012).

No presente trabalho, nosso objetivo foi desenvolver uma plataforma mais simples de ensaio, baseada na citometria multiplex, que pudesse pré-selecionar indivíduos com anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor (BIABs). Para tal, usou-se como referência para BIABs o ensaio de citoaderência de COS-7. A metodologia apresenta vantagens com relação ao tempo de execução, automatização, e permite a utilização de quantidades significativamente reduzidas de amostra (CARINELLI et al., 2015). Essa metodologia tem sido uma ferramenta importante para a detecção de anticorpos contra multiplex antígenos em estudos sorológicos de base populacional (LAL et al., 2004; LONGLEY et al., 2017a; PICKERING et al., 2002a), principalmente quando envolve populações onde apenas uma pequena quantidade de amostra pode ser obtida.

Em uma primeira etapa, os ensaios de titulação no formato simplex permitiram demonstrar que o ensaio pela citometria de fluxo era capaz de diferenciar corretamente as amostras que apresentam resposta inibitória anti-DBPII. Além disso, o processo de acoplamento dos antígenos não interferiu com a exposição conformacional dos epítomos inibitórios (reconhecidos pelo anticorpo monoclonal 2D10). Isto é particularmente relevante porque a estrutura de cristal do complexo DBPII/2D10 mostrou que o mAb 2D10 tem como alvo os epítomos DBPII dependentes da ligação dissulfeto que são críticos para a conformação da proteína necessária ao reconhecimento do receptor DARC (CHEN et al., 2016). Apesar de

um único anticorpo monoclonal inibitório ter sido usado como controle nos nossos experimentos, Chen e colaboradores (2016) demonstraram que esse monoclonal é capaz de se ligar em diferentes alelos de DBP2; em particular, os mesmos autores mostraram que os epítomos reconhecidos por 2D10 eram conservados em mais de 90% das sequências de DBP2 (CHEN et al., 2016; DE SOUSA; CARVALHO; DE BRITO, 2011).

Em uma segunda etapa, grupos de amostras bem caracterizados para a resposta de anticorpos anti-DBP2 (HR- alto respondedor, NR-não respondedor, e NE- não expostos) confirmaram o desempenho semelhante do ensaio nas versões simplex ou multiplex. Estes resultados reforçam a importância da citometria de fluxo que permitiu utilizar quantidades mínimas de amostras para a detecção multiplex de anticorpos anti-DBP2. De fato, a citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada em outros estudos de malária humana (FOUDA et al., 2006; PRIEST et al., 2018).

Para investigar se o ensaio sorológico multiplex pela citometria de fluxo poderia ser indicativo da presença de anticorpos com atividade bloqueadora da interação DBP2-DARC (BIAbs), um painel de amostras de indivíduos adultos, com história de longa exposição ao *P. vivax*, foi caracterizado pelo ensaio funcional utilizando células COS-7. Os resultados demonstraram que a habilidade do ensaio sorológico multiplex de corretamente identificar indivíduos com BIAbs estava associada com a detecção de anticorpos contra epítomos conservados (DEKnull-2) e polimórficos (Sal-1 e Brz-1) da DBP2. De fato, a análise de razão de chances (OR) mostrou que a positividade no ensaio multiplex para as três proteínas recombinantes aumentou as chances de se identificar indivíduos com BIAbs em aproximadamente 12 vezes, com uma acurácia de 90%. Em conjunto, estes resultados indicam que a amplitude de resposta de anticorpos (reconhecimento de múltiplas variantes de DBP2) foi mais indicativo da presença de BIAbs do que os níveis de anticorpos anti-DBP2. Considerando que a atividade inibitória está associada com uma resposta de ampla reatividade à DBP2, podemos assumir que no nosso ensaio a detecção de anticorpos contra diferentes variantes alélicas de DBP2 é mais relevante do que a avaliação dos níveis de anticorpos para cada proteína.

Apesar de Sal-1 e Brz-1 serem variantes alélicas de DBP2 prevalentes na área de estudo (DE SOUSA; CARVALHO; DE BRITO, 2011; KANO et al., 2012;

SOUSA et al., 2010), foi observado uma resposta predominante de DEKnull-2. Esse resultado era esperado, uma vez que, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a resposta de anticorpos contra os epítomos polimórficos presentes em variantes nativas de DBPII (como Sal-1 e Brz-1) podem ser influenciada por variação sazonal da transmissão de malária (PIRES et al., 2018). Por outro lado, a resposta imune contra epítomos conservados presentes em DEKnull-2 se mantem relativamente estável e associada a imunidade naturalmente adquirida (MEDEIROS et al., 2020). De fato, diferentes trabalhos já confirmaram a associação entre proteção clínica e BIAbs (COLE-TOBIAN et al., 2009; HE et al., 2019; KING et al., 2008), incluindo na Amazônia brasileira (NICOLETE et al., 2016).

Embora os resultados do ensaio multiplex sejam promissores, o presente trabalho possui limitações que devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados. Primeiramente, não foram utilizadas amostras de IgG purificadas para confirmação do acoplamento. Apesar disto, foram utilizadas curvas dose-resposta de amostras bem caracterizadas para a resposta inibitória de BIAbs (positivas e negativas) e de elevada reatividade na sorologia convencional de ELISA, que confirmaram a especificidade do ensaio utilizando diferentes concentrações do conjugado anti-IgG humano de alta especificidade. Além disso, o nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado (microscopia confocal) que a atividade de BIAbs é caracterizada por anticorpos IgG neutralizantes de elevada especificidade (CERAVOLO et al., 2008). Em conjunto, estes resultados confirmam a especificidade do ensaio em detectar anticorpos IgG anti-DBPII.

Outra limitação do ensaio aqui utilizado foi não ter validado as amostras BIAbs positivas através de ensaios de inibição da invasão de merozoítos de *P. vivax* em culturas de reticulócitos de curta duração. Apesar disto, em estudos anteriores, o grupo já tinha demonstrado que anticorpos anti-DEKnull-2 são capazes de inibir a invasão de merozoítos em reticulócitos humanos (NTUMNGIA et al., 2017). Devido as dificuldades de se conduzir cultura de *P. vivax* de curta duração (ARMISTEAD; ADAMS, 2018), aqui optou-se em estabelecer a atividade inibitória dos anticorpos anti-DBPII através do ensaio considerando de referência de BIAbs, onde a interação DBPII-DARC é avaliada empregando-se duas células, isto é COS-7 expressando a DBPII e eritrócitos DARC positivos. No entanto, estamos de acordo com outros autores que destacam que a interpretação dos ensaios de inibição da interação

DARC-DBP11 deve ser abordada com cautela. Rawlinson e colaboradores (2019) demonstrou que alguns mAbs humanos anti-DBP11 que bloqueavam a invasão do parasito não foram capazes de bloquear a interação DARC-DBP11 em ensaios *in vitro* (ensaio de inibição – ELISA) (RAWLINSON et al., 2019). Entretanto, estes autores utilizaram um ensaio que contém apenas fragmentos do receptor DARC, o que pode ter ocasionado esta diferença. Nesse sentido, pode-se especular que ensaios envolvendo interação célula-célula (como no caso da COS-7 e eritrócitos) possa ser mais adequado. De fato, embora todos os ensaios funcionais *in vitro* apresentem limitações, ensaios baseados na interação DARC-DBP11 já se mostram fundamentais para confirmar que anticorpos anti-DBP11 estão associados com imunidade clínica (COLE-TOBIAN et al., 2009; HE et al., 2019; KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016).

Em conjunto os resultados permitem concluir que o protocolo descrito no presente trabalho possibilita identificar com elevada acurácia indivíduos potencialmente carreadores de anticorpos anti-DBP11 capazes de bloquear a interação ligante-receptor. Acredita-se que esta abordagem poderá ser útil para ampliar a detecção de indivíduos com BIAs em estudos de base populacional. Para isso, é essencial adaptar a plataforma multiplex para incluir variantes alélicas de DBP11 prevalentes na área de estudo em questão.

Parte II – Ensaio sorológico pela citometria de fluxo como indicativo de malária aguda ou recente por *Plasmodium vivax*

À medida que os países endêmicos avançam para a eliminação da malária, a prevalência das infecções diminui, sendo as estimativas de transmissão dependente de ensaios em massa que avaliam baixas densidades parasitárias. Mesmo em áreas de baixa transmissão, as estimativas são a de que os indivíduos assintomáticos representam reservatórios importantes de infecção (CHENG; CUNNINGHAM; GATTON, 2015; IMWONG et al., 2015). Enquanto a microscopia e os RDTs, métodos convencionais de diagnóstico, detectam apenas um quarto de todas as infecções por *Plasmodium* (IMWONG et al., 2015), os métodos moleculares mais sensíveis tem limitação (COSTA et al., 2014). Neste sentido, uma alternativa seria desenvolver protocolos sorológicos para detectar anticorpos contra as formas sanguíneas dos parasitos (LONGLEY et al., 2020; YMAN et al., 2016). Isto é

particularmente relevante no caso do *P. vivax* já que as infecções submicroscópicas predominam nesta espécie quando comparada a infecção por *P. falciparum*, mesmo em áreas de baixa transmissão (CHENG; CUNNINGHAM; GATTON, 2015; HARRIS et al., 2010).

O emprego de ferramentas imunológicas, tais como a detecção de anticorpos antígeno-específico, poderá contribuir não só para a notificação de casos clínicos, mas também como ferramenta potencial para avaliar a dinâmica de transmissão, detectar reservatórios de infecção e direcionar as medidas de controle (FOLEGATTI et al., 2017). Nesse contexto, os ensaios sorológicos pela citometria de fluxo também têm demonstrado uma alta sensibilidade e especificidade como ferramenta de vigilância epidemiológica, podendo fornecer um monitoramento adequado na avaliação da resposta de anticorpos específicos durante a malária sintomática (KOFFI et al., 2015; PRIEST et al., 2016).

A segunda parte desse trabalho se propôs a estabelecer uma plataforma sorológica pela citometria de fluxo, para determinar infecção aguda, ou exposição recente ao *P. vivax*, através resposta de anticorpos contra antígenos sanguíneos altamente imunogênicos. De forma importante, essa metodologia tem como objetivo contribuir como método de triagem para banco de sangue bem como diagnóstico individual em áreas tradicionalmente não endêmicas, como é o caso da região extra-Amazônica. Isto é relevante já que em áreas endêmicas a resposta de anticorpos contra antígenos altamente imunogênicos, como os utilizados aqui, pode também ser indicativa de longa exposição à malária nas áreas endêmicas (CUTTS et al., 2014; FOLEGATTI et al., 2017)

Visando empregar a citometria de fluxo para detecção de anticorpos contra proteínas altamente imunogênicas do *P. vivax*, empregou-se aqui uma proteína quimérica que se mostrou altamente imunogênica em camundongos e reconhecida por soros de indivíduos residentes em área endêmica de malária (ROCHA et al., 2017). Aqui, confirmou-se a elevada reatividade da proteína quimérica, que foi reconhecida por cerca de 80% dos indivíduos primoinfectados pelo *P. vivax*, na sorologia convencional de ELISA. Análises de correlação demonstraram ainda que, a resposta de anticorpos contra a proteína quimérica se correlacionou com a resposta dos antígenos avaliados individualmente, isto é, AMA-1 e MSP1-19. Vale ressaltar que, nenhum dos indivíduos do grupo controle (não infectados) apresentou

uma resposta de anticorpos (IgM ou IgG) na sorologia convencional de ELISA para quaisquer dos antígenos (100% especificidade). Em conjunto, esses achados reforçam os dados anteriores com a proteína quimérica (ROCHA et al., 2017) e demonstram o seu uso potencial na determinação da resposta de anticorpos em primoinfecção por *P. vivax*.

Considerando o ensaio aqui desenvolvido, os resultados permitiram demonstrar que tanto a proteína quimérica quanto as proteínas individuais foram satisfatoriamente acopladas às microesferas, o que foi confirmado por ensaios de titulação com pools de amostras sabidamente positivas, com diferentes níveis de reatividade. O ensaio de titulação demonstrou uma diferença significativa entre a reatividade dos pools amostras negativas e positivas tanto para a resposta de IgM quanto IgG. Além disso, os níveis de reatividade dos pools positivos no ensaio pela citometria se correlacionaram com os resultados da sorologia convencional (i.e., alta > média > baixa reatividade). Ressalta-se que no painel de amostras controles aqui utilizados não foram encontrados amostras de elevada reatividade para o antígeno AMA-1 (IR>8). Além disso, nas amostras de indivíduos primoinfectados avaliadas no presente trabalho, a proteína AMA-1 apresentou uma baixa reatividade de anticorpos (IgM e IgG) quando comparado com grupo controle, e as proteínas MSP1-19 e quimérica. As razões para tal fato não são conhecidas, mas pode ser atribuído a alguns fatores como: (i) imunogenicidade de AMA-1, já que o antígeno está localizado no complexo apical do parasito, podendo ser exposto durante um curto período do processo de invasão o que poderia comprometer seu reconhecimento pelo sistema imune, assim como ocorre com outros antígenos do complexo apical como a DBP II. De fato, diferentes trabalhos mostram que, mesmo em áreas de alta transmissão, a prevalência e intensidade de anticorpos contra AMA-1 se correlaciona com idade e episódios prévios de malária (CORTÉS et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; SALAVATIFAR et al., 2015); (ii) variabilidade antigênica de AMA-1, pois está bem descrito na literatura o alto grau de polimorfismo em algumas regiões da proteína, inclusive a ocorrência de sítios polimórfico em epítopos de célula B, principalmente em regiões dos antígenos que são expostos na superfície, que podem comprometer o reconhecimento de anticorpos e geração da memória imunológica (BAI et al., 2005). Alguns trabalhos demonstraram uma heterogeneidade na prevalência da resposta de anticorpos contra AMA-1

influenciada pela variabilidade (BITTENCOURT et al., 2020; GARG et al., 2007). Entretanto, estudos recentes tem demonstrado que a AMA-1 da variante Belém possui epítomos imunogênicos conservados entre diferentes variantes circulando globalmente em áreas endêmicas de malária (FRANÇA et al., 2021). Uma vez que avaliamos a resposta em um grupo de amostras com exposição limitada ao *P. vivax*, e de diferentes regiões geográficas, esses fatores podem ter influenciado na baixa reatividade de AMA-1, e que conseqüentemente, refletiram na performance desse antígeno. Como demonstrado pelas curvas ROC, AMA-1 apresentou uma acurácia inferior, quando comparado à MSP1-19 e a proteína quimérica.

Por outro lado, como era esperado, a proteína MSP1-19 foi altamente imunogênica nas populações de estudo (SOARES et al., 1997, 1999a). Além disto, os altos títulos de anticorpos presentes na amostra podem ter contribuído para um deslocamento da curva de titulação de anticorpos IgM à direita (pool de elevada reatividade – vermelho), se comportando de forma diferente à titulação dos pools de reatividade mais baixa. Esse fato pode ser atribuído a elevada concentração de anticorpos presente na amostra em diluições mais concentradas, que interfere na formação do complexo antígeno-anticorpo, também conhecido como efeito “*prozone*”. Esse efeito é descrito na literatura e comumente relatado em ensaios sorológicos onde resultados falso negativos são encontrados em consequência do efeito “*prozone*” (SIDANA et al., 2011; WOLLERSHEIM et al., 2015). Esse resultado ressalta a importância dos ensaios de titulação em ensaios sorológicos, principalmente ao utilizar metodologias de elevada sensibilidade como a citometria de fluxo, para encontrar a melhor diluição que permite discriminar de forma acurada amostras positivas e negativas.

De uma maneira geral não foi observada diferença significativa na resposta de anticorpos (IgM/IgG) entre a MSP1-19 e a proteína quimérica. Estes resultados, em amostras de indivíduos primoinfectados, corroboram achados prévios em indivíduos com história de múltiplas infecções por *P. vivax* (ROCHA et al., 2017). Apesar disto, os resultados com a proteína quimérica na citometria de fluxo demonstram reatividade inespecífica menor quando comparado aos antígenos individuais. De fato, tanto para a resposta de anticorpos IgM quando IgG, as análises de correlação confirmaram uma reatividade desprezível com amostras de indivíduos nunca expostos ao *P. vivax*. Esse dado demonstram um ganho de especificidade ao

utilizar a proteína quimérica, que foi confirmado quando se avaliou os parâmetros de sensibilidade e especificidade para cada um dos antígenos. Baseado em curvas TG-ROC optou-se aqui por determinar um valor de cut-off considerando uma especificidade elevada do ensaio (mínimo 80%). Esta estratégia permitiu confirmar o melhor desempenho da proteína quimérica em relação aos antígenos individuais, que alcançou valores de especificidade que variaram de 90- 95%, apesar da sensibilidade similar a MSP1-19 (em torno de 60%).

Ressalta-se ainda que os níveis de parasitos circulantes podem influenciar na performance do ensaio. Especificamente, foi possível demonstrar que indivíduos com parasitemias superiores à 500parasitosm/mm³ (microscopia) apresentaram uma resposta de IgG superior aos indivíduos com parasitemias inferiores. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre a resposta de anticorpos e o período de sintomas, observou-se uma tendência de aumento da resposta de anticorpos IgG com o passar do tempo. É possível especular que a inclusão de outros antígenos, bem como a avaliação de subclasses de IgG, poderia contribuir para aumentar a sensibilidade do ensaio em condições de baixas parasitemias.

Diante do melhor desempenho da proteína quimérica no ensaio multiplex, em uma próxima etapa, investigou-se a cinética da resposta de anticorpos contra este antígeno. Para tal, amostras plasmáticas dos indivíduos expostos a um único episódio de transmissão de *P. vivax* (CERAVOLO et al., 2009) foram avaliadas até 12 meses após a infecção única. Os resultados demonstraram que a resposta de anticorpos IgG (mas não de IgM) a proteína quimérica foi adequada para indicar novos episódios de infecção sanguínea. Enquanto os títulos de anticorpos IgG caíram rapidamente nos indivíduos que se curaram, os títulos se mantiveram elevados naqueles que tiveram recaídas devido a reativação das formas latentes do fígado (hipnozoítos). Do ponto de vista epidemiológico, a importância desse resultado se deve ao fato de que os episódios de recaídas (reagudização da doença) são responsáveis pela manutenção da transmissão e podem levar à reintrodução da doença, onde a malária tenha sido eliminada. Com isso, ferramentas de vigilância epidemiológica precisam ser implementadas para identificação e controle da transmissão, particularmente, em regiões não-endêmicas onde os surtos de transmissão tem sido frequentes (BRASIL et al., 2017). Neste sentido, a metodologia

aqui desenvolvida tem potencial para ser utilizada para rastrear indivíduos potencialmente expostos à transmissão bem como na triagem de potenciais doadores em banco de sangues localizados fora da área endêmica.

De importância, a descoberta de novos antígenos de *P. vivax* tem sugerido que a detecção de anticorpos possa ser usada para monitorar infecções agudas e/ou recentes também em áreas endêmicas (FOLEGATTI et al., 2017; LONGLEY et al., 2020). Neste sentido, os resultados aqui apresentados com a proteína quimérica em amostras de indivíduos primoinfectados, mas residentes em áreas endêmicas de malária, sugerem que mesmo a primoinfecção em área endêmica pode ser detectada com antígenos imunogênicos como os que compõe a proteína quimérica; neste sentido, a positividade dos primoinfectados de área endêmica foi de 90-100% em um período de até 28 dias.

7. Conclusões

Os resultados desse trabalho permitem concluir que:

- 1) O ensaio sorológico multiplex pela citometria de fluxo utilizando diferentes construções de DBPII permite discriminar de forma acurada indivíduos que apresentam uma resposta de anticorpos bloqueadores da interação ligante-receptor (DBPII-DARC). Mais especificamente:
 - 1.1 O processo de acoplamento covalente dos antígenos às microesferas não compromete a exposição de epítomos conformacionais que são relevantes para a interação DBPII-DARC -;
 - 1.2 A versão do ensaio em plataforma multiplex garante que diferentes construções de DBPII possam ser incluídas no mesmo ensaio;
 - 1.3 A utilização de múltiplas construções de DBPII é crítica para que o ensaio de citometria de fluxo possa ser associado a atividade inibitória dos anticorpos anti-DBPII;
 - 1.4 O ensaio multiplex pela citometria de fluxo é uma ferramenta com potencial para ser utilizada em estudos de base populacional, que envolvem uma grande quantidade de amostras, para a triagem inicial de indivíduos com resposta de anticorpos bloqueadores

- 2) Na região extra-Amazônica, a avaliação da resposta de anticorpos contra a proteína quimérica AMA-1/MSP1-19 em ensaio sorológico pela citometria de fluxo tem potencial como ferramenta de vigilância para identificar indivíduos com infecção aguda e/ou exposição recente ao *Plasmodium vivax*. Mais especificamente,
- 2.1 O ensaio de citometria permitiu o acoplamento com sucesso das proteínas recombinantes, sendo a performance da proteína quimérica significativamente superior, quando comparado com as proteínas não quiméricas, demonstrando alta especificidade e acurácia;
 - 2.2 O ensaio de citometria com a proteína quimérica demonstrou ser adequado para identificar efeito “*booster*” da resposta de anticorpos IgG em situações de recaídas.
 - 2.3 A detecção simultânea da resposta de anticorpos IgM e IgG permite aumentar significativa a performance do ensaio, pois resulta em aumento na sensibilidade.

Referências bibliográficas

ADAMS, J. H. et al. The duffy receptor family of plasmodium knowlesi is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell**, v. 63, n. 1, p. 141–153, out. 1990.

ADAMS, J. H. et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 15, p. 7085–7089, 1 ago. 1992.

AMANFO, S. A. et al. Seroepidemiology of Plasmodium species infections in Zimbabwean population. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 267, 10 dez. 2016.

AMINO, R. et al. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. **Comptes Rendus - Biologies**, 2006.

AMINO, R. et al. Host Cell Traversal Is Important for Progression of the Malaria Parasite through the Dermis to the Liver. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 2, p. 88–96, fev. 2008.

ANTONELLI, L. R. et al. The immunology of Plasmodium vivax malaria. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 163–189, 23 jan. 2020.

ARMISTEAD, J. S.; ADAMS, J. H. Advancing Research Models and Technologies to Overcome Biological Barriers to Plasmodium vivax Control. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 114–126, fev. 2018.

BAI, T. et al. Structure of AMA1 from Plasmodium falciparum reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 36, p. 12736–41, 6 set. 2005.

BARGIERI, D. Y. et al. Adjuvant requirement for successful immunization with recombinant derivatives of Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 delivered via the intranasal route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 313–318, 10 maio 2007.

BARGIERI, D. Y. et al. New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132–6142, nov. 2008.

BATCHELOR, J. D.; ZAHM, J. A.; TOLIA, N. H. Dimerization of Plasmodium vivax DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. **Nature Structural and Molecular Biology**, 2011.

BATTLE, K. E. et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of Plasmodium vivax, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. **The Lancet**, v. 394, n. 10195, p. 332–343, jul. 2019.

BHARDWAJ, R. et al. Production of recombinant PvDBP-II, receptor binding domain of Plasmodium vivax Duffy binding protein, and evaluation of immunogenicity to identify an adjuvant formulation for vaccine development. **Protein Expression and Purification**, v. 136, p. 52–57, ago. 2017.

BITTENCOURT, N. C. et al. Plasmodium vivax AMA1: Implications of distinct haplotypes for immune response. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p.

e0008471, 8 jul. 2020.

BLACKMAN, M. J. et al. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, 1990a.

BLACKMAN, M. J. et al. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 1, p. 379–382, 1 jul. 1990b.

BOUILLET, L. É. M. et al. Long-Term Humoral and Cellular Immune Responses Elicited by a Heterologous Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 Protein Prime/Adenovirus Boost Immunization Protocol. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3642–3652, set. 2011.

BOUSEMA, T. et al. Serologic Markers for Detecting Malaria in Areas of Low Endemicity, Somalia, 2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 392–399, mar. 2010.

BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017.

CARINELLI, S. et al. Biomarker detection of global infectious diseases based on magnetic particles. **New Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 521–532, set. 2015.

CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2 jan. 2019.

CASSIANO, G. C. et al. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N-terminal antigen of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 306, 3 dez. 2016.

CAVASINI, C. E. et al. Plasmodium vivax infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 10, p. 1042–1044, out. 2007.

CERAVOLO, I. P. et al. Inhibitory Properties of the Antibody Response to Plasmodium vivax Duffy Binding Protein in an Area with Unstable Malaria Transmission. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, n. 3, p. 270–278, mar. 2008.

CERAVOLO, I. P. et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 156, n. 3, p. 502–510, jun. 2009.

CERAVOLO, I. P. et al. Naturally Acquired Antibodies to Plasmodium vivax Duffy Binding Protein (DBP) in Rural Brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 185–193, 1 fev. 2010.

CERÁVOLO, I. P. et al. Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 6, p. 675–81, 1 jun. 2005.

- CHAM, G. K. K. et al. A semi-automated multiplex high-throughput assay for measuring IgG antibodies against Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) domains in small volumes of plasma. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 108, 12 dez. 2008.
- CHAN, L. et al. Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. **Cellular Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 8 jan. 2020.
- CHEN, E. et al. Broadly neutralizing epitopes in the Plasmodium vivax vaccine candidate Duffy Binding Protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 22, p. 6277–6282, 31 maio 2016.
- CHENG, Q.; CUNNINGHAM, J.; GATTON, M. L. Systematic Review of Sub-microscopic P. vivax Infections: Prevalence and Determining Factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3413, 8 jan. 2015.
- CHENG, Y. et al. The Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 Paralog Is a Novel Erythrocyte-Binding Ligand of P. vivax. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 5, p. 1585–1595, maio 2013.
- CHITNIS, C. et al. Plasmodium vivax Invasion of Human Erythrocytes Inhibited by Antibodies Directed against the Duffy Binding Protein. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. e337, 2007.
- CHITNIS, C. E. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. **Current Opinion in Hematology**, v. 8, n. 2, p. 85–91, mar. 2001.
- CHITNIS, C. E.; MILLER, L. H. Identification of the erythrocyte binding domains of Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi proteins involved in erythrocyte invasion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 2, p. 497–506, 1 ago. 1994.
- CHOE, H. et al. Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and Plasmodium vivax Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1413–1422, 21 jan. 2005.
- CHOOTONG, P. et al. Mapping epitopes of the Plasmodium vivax Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. **Infection and Immunity**, 2010.
- CHOOTONG, P. et al. Characterization of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II Immunity: Approach to Plasmodium vivax Vaccine Development in Thailand. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35769, 27 abr. 2012.
- CHOTIVANICH, K. et al. Ex-vivo short-term culture and developmental assessment of Plasmodium vivax. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6, p. 677–680, nov. 2001.
- COLE-TOBIAN, J. L. et al. Strain-Specific Duffy Binding Protein Antibodies Correlate with Protection against Infection with Homologous Compared to Heterologous Plasmodium vivax Strains in Papua New Guinean Children. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 4009–4017, set. 2009.
- COLEY, A. M. et al. Structure of the Malaria Antigen AMA1 in Complex with a Growth-Inhibitory Antibody. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 9, p. e138, 28 set. 2007.
- COOK, J. et al. Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 169, 16 dez. 2010.

- COOPER, J. A. Merozoite surface antigen-1 of plasmodium. **Parasitology Today**, v. 9, n. 2, p. 50–54, fev. 1993.
- COR C. J. FONTES, IAN BATHURST, A. U. K. Plasmodium Vivax sporozoite antibodies in individuals exposed during a single malaria outbreak in an non-endemic area. **The American Society of Tropical medicine and Hygiene**, v. 44, n. 1, p. 28–33, 1991.
- CORTÉS, A. et al. Allele Specificity of Naturally Acquired Antibody Responses against Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 422–430, jan. 2005.
- COSTA, D. C. et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: How reproducible are polymerase chain reaction-based methods? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 21–28, 2014.
- COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 6, p. 961–971, 2012.
- COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, fev. 2006.
- COX-SINGH, J. et al. Plasmodium knowlesi Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 165–171, 15 jan. 2008.
- COX-SINGH, J.; SINGH, B.; KRISHNA, S. Plasmodium knowlesi: the Fifth Human Malarial Parasite. In: **Emerging Infections 9**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2010. p. 261–271.
- CRUZ MARQUES, A. Human migration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitology Today**, v. 3, n. 6, p. 166–170, jun. 1987.
- CUTTS, J. C. et al. Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. **BMC Medicine**, v. 12, n. 1, p. 150, 9 dez. 2014.
- DA SILVA-NUNES, M. et al. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta Tropica**, v. 121, n. 3, p. 281–291, mar. 2012.
- DAWSON, G. J. et al. Isolation and Characterization of the MSP1 Genes from Plasmodium malariae and Plasmodium ovale. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 996–1003, 1 jun. 2010.
- DE ALVARENGA, D. et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by Plasmodium simium. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 81, 2015.
- DE CASTRO, A. B. et al. How Immigrant Workers Experience Workplace Problems: A Qualitative Study. **Archives of Environmental & Occupational Health**, v. 61, n. 6, p. 249–258, 7 nov. 2006.
- DE NIZ, M. et al. Plasmodium gametocytes display homing and vascular

transmigration in the host bone marrow. **Science Advances**, v. 4, n. 5, p. eaat3775, 30 maio 2018.

DE, S. L. et al. Progress towards the development of a *P. vivax* vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 20, n. 2, p. 97–112, 1 fev. 2021.

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

DE SOUSA, T. N.; CARVALHO, L. H.; DE BRITO, C. F. A. Worldwide genetic variability of the duffy binding protein: Insights into *Plasmodium vivax* vaccine development. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–8, 2011.

DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. suppl 3, p. 1–20, 1992.

DEL PORTILLO, H. A. et al. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 9, p. 4030–4034, 1 maio 1991.

DOBRESCU, I. et al. Protective Immunity in Mice Immunized With *P. vivax* MSP119-Based Formulations and Challenged With *P. berghei* Expressing PvMSP119. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–17, 2020.

DOUGLAS, N. M. et al. Gametocyte Dynamics and the Role of Drugs in Reducing the Transmission Potential of *Plasmodium vivax*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 5, p. 801–812, 1 set. 2013.

DRAKELEY, C. J. et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, p. 5108–5113, 5 abr. 2005.

DRAPER, S. J. et al. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 1, p. 43–56, jul. 2018.

DUTTA, S. et al. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 21, p. 12295–12300, 14 out. 2003.

FANG, X. et al. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 125–132, jan. 1991.

FERNANDEZ-BECERRA, C. et al. Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 29, 2010.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 284, 20 dez. 2016.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Malaria Situation in Latin America and the Caribbean: Residual and Resurgent Transmission and Challenges for Control and Elimination. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. p. 57–70.

FOLEGATTI, P. M. et al. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in

the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 107, 7 dez. 2017.

FORMAGLIO, P. et al. Loss of host cell plasma membrane integrity following cell traversal by Plasmodium sporozoites in the skin. **Parasitology International**, v. 63, n. 1, p. 237–244, fev. 2014.

FOUDA, G. G. et al. Multiplex Assay for Simultaneous Measurement of Antibodies to Multiple Plasmodium falciparum Antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 12, p. 1307–1313, dez. 2006.

FOWKES, F. J. et al. New Insights into Acquisition, Boosting, and Longevity of Immunity to Malaria in Pregnant Women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 10, p. 1612–1621, 15 nov. 2012.

FRANÇA, A. C. B. et al. Antibodies Against the Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 From the Belem Strain Share Common Epitopes Among Other Worldwide Variants. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. March, p. 1–13, 16 mar. 2021.

FREEMAN, R. R.; HOLDER, A. A. Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of Plasmodium falciparum merozoites. **The Rockefeller University Press**, v. 158, n. November, p. 1647–1653, 1983.

GARG, S. et al. Sequence diversity and natural selection at domain I of the apical membrane antigen 1 among Indian Plasmodium falciparum populations. **Malaria journal**, v. 6, p. 154, 22 nov. 2007.

GAUR, D.; MAYER, D. C. G.; MILLER, L. H. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by Plasmodium merozoites. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 13–14, p. 1413–1429, dez. 2004.

GENTIL, F. et al. A recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6183–6190, ago. 2010.

GILBERGER, T.-W. et al. A Novel Erythrocyte Binding Antigen-175 Parologue from Plasmodium falciparum Defines a New Trypsin-resistant Receptor on Human Erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14480–14486, 18 abr. 2003.

GRILLET, M. E. et al. Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications for spillover in the region. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. e149–e161, maio 2019.

GRUSZCZYK, J. et al. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 48–55, 5 jan. 2018.

GUNALAN, K. et al. Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation? **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 5, p. 420–429, maio 2018.

HARRIS, I. et al. A large proportion of asymptomatic Plasmodium infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting.

Malaria Journal, v. 9, n. 1, p. 254, 7 dez. 2010.

HE, W. et al. Antibody responses to Plasmodium vivax Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical Malaria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0006987, 15 fev. 2019.

HEALER, J. et al. Independent Translocation of Two Micronemal Proteins in Developing Plasmodium falciparum Merozoites. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5751–5758, out. 2002.

HODDER, A. N. et al. The Disulfide Bond Structure of Plasmodium Apical Membrane Antigen-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29446–29452, 15 nov. 1996.

HUSSEIN, M. I. H. et al. Malaria and COVID-19: unmasking their ties. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 457, 23 dez. 2020.

IMWONG, M. et al. The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand–Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 381, 30 dez. 2015.

KADEKOPPALA, M.; HOLDER, A. A. Merozoite surface proteins of the malaria parasite: The MSP1 complex and the MSP7 family. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 10, p. 1155–1161, ago. 2010.

KANJEE, U. et al. Molecular and cellular interactions defining the tropism of Plasmodium vivax for reticulocytes. **Current opinion in microbiology**, v. 46, p. 109–115, dez. 2018a.

KANJEE, U. et al. Molecular and cellular interactions defining the tropism of Plasmodium vivax for reticulocytes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 109–115, dez. 2018b.

KANO, F. S. et al. Plasmodium vivax Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine & International Health**, v. 17, n. 8, p. 989–1000, ago. 2012.

KANO, F. S. et al. The Presence, Persistence and Functional Properties of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005177, 13 dez. 2016.

KHO, W.-G. et al. Analysis of polymorphic regions of Plasmodium vivax Duffy binding protein of Korean isolates. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 143, 2001.

KING, C. L. et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8363–8368, 17 jun. 2008.

KOCKEN, C. H. M. et al. Molecular characterisation of Plasmodium reichenowi apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with P. falciparum AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 109, n. 2, p. 147–156, jul. 2000.

- KOFFI, D. et al. Analysis of antibody profiles in symptomatic malaria in three sentinel sites of Ivory Coast by using multiplex, fluorescent, magnetic, bead-based serological assay (MAGPIX™). **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 509, 21 dez. 2015.
- KOUSSIS, K. et al. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 6, p. 725–735, 18 mar. 2009.
- KUSI, K. A. et al. Variations in the quality of malaria-specific antibodies with transmission intensity in a seasonal malaria transmission area of Northern Ghana. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185303, 25 set. 2017.
- LAL, G. et al. Development and Evaluation of a Tetraplex Flow Cytometric Assay for Quantitation of Serum Antibodies to Neisseria meningitidis Serogroups A, C, Y, and W-135. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 2, p. 272–279, mar. 2004.
- LAL, G. et al. Development and validation of a nonplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine Streptococcus pneumoniae serotypes. **Journal of Immunological Methods**, v. 296, n. 1–2, p. 135–147, jan. 2005.
- LAURENS, M. B. The Promise of a Malaria Vaccine—Are We Closer? **Annual Review of Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 273–292, 8 set. 2018.
- LEVITT, D. G.; SCHOEMAKER, R. C. Human physiologically based pharmacokinetic model for ACE inhibitors: ramipril and ramiprilat. **BMC Clinical Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 1, 6 dez. 2006.
- LIM, S. S. et al. Development of Inhibitors of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 Based on Fragment Screening. **Australian Journal of Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 1530, 2013.
- LIMA-JUNIOR, J. C. et al. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 Alleles on IgG Antibody Response to the P. vivax MSP-1, MSP-3 α and MSP-9 in Individuals from Brazilian Endemic Area. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36419, 23 maio 2012.
- LIMA, L. C. et al. A Multistage Formulation Based on Full-Length CSP and AMA-1 Ectodomain of Plasmodium vivax Induces High Antibody Titers and T-cells and Partially Protects Mice Challenged with a Transgenic Plasmodium berghei Parasite. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 916, 17 jun. 2020.
- LIMONGI, J. E. et al. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 232–237, jun. 2008.
- LONGLEY, R. J. et al. Naturally acquired antibody responses to more than 300 Plasmodium vivax proteins in three geographic regions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005888, 11 set. 2017a.
- LONGLEY, R. J. et al. Asymptomatic Plasmodium vivax infections induce robust IgG responses to multiple blood-stage proteins in a low-transmission region of western Thailand. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 178, 28 dez. 2017b.
- LONGLEY, R. J. et al. Development and validation of serological markers for detecting recent Plasmodium vivax infection. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 741–749, 11 maio 2020.
- LORENZ, C. et al. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian

- regions of Brazil. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 408, 15 dez. 2015.
- MALLERET, B. et al. Plasmodium vivax: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1314–1324, 19 fev. 2015.
- MALLERET, B. et al. Plasmodium vivax binds host CD98hc (SLC3A2) to enter immature red blood cells. **Nature microbiology**, v. 6, n. 8, p. 991–999, 22 ago. 2021.
- MARKUS, M. B. Do hypnozoites cause relapse in malaria? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 6, p. 239–245, jun. 2015.
- MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 1–2, p. 51–60, jan. 2006.
- MAYER, D. C. G. et al. Characterization of a Plasmodium falciparum erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 9, p. 5222–5227, 24 abr. 2001.
- MEDEIROS, C. M. P. et al. Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. **PLOS ONE**, v. 15, n. 5, p. e0232786, 7 maio 2020.
- MEDICA, D. L.; SINNIS, P. Quantitative Dynamics of Plasmodium yoelii Sporozoite Transmission by Infected Anopheline Mosquitoes. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4363–4369, jul. 2005.
- MELLO-VIEIRA, J. et al. Plasmodium translocon component EXP2 facilitates hepatocyte invasion. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5654, 6 dez. 2020.
- METCALF, C. J. E. et al. Use of serological surveys to generate key insights into the changing global landscape of infectious disease. **The Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 728–730, ago. 2016.
- MICHON, P.; FRASER, T.; ADAMS, J. H. Naturally Acquired and Vaccine-Elicited Antibodies Block Erythrocyte Cytoadherence of the Plasmodium vivax Duffy Binding Protein. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3164–3171, 1 jun. 2000.
- MORAIS, C. G. et al. Antibodies to Plasmodium Vivax Apical Membrane Antigen 1: Persistence and correlation with malaria transmission intensity. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 582–587, 1 out. 2006.
- MOTA, M. M.; HAFALLA, J. C. R.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1318–1322, 1 nov. 2002.
- MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. **Migration through host cells by apicomplexan parasites** *Microbes and Infection*, 2001.
- MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells: the first steps of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1113–1118, dez. 2004.
- MOTEVALLI HAGHI, A. et al. A Recombinant Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen-1 to Detect Human Infection in Iran. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 15–21, 6 mar. 2012.

- MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, set. 2009.
- MÚFALO, B. C. et al. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12–13, p. 1266–1273, out. 2008.
- NAING, C. et al. Is *Plasmodium vivax* Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3071, 14 ago. 2014.
- NAIR, M. et al. Structure of Domain III of the Blood-stage Malaria Vaccine Candidate, *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1). **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 4, p. 741–753, set. 2002.
- NGASSA MBENDA, H. G.; DAS, A. Molecular Evidence of *Plasmodium vivax* Mono and Mixed Malaria Parasite Infections in Duffy-Negative Native Cameroonians. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103262, 1 ago. 2014.
- NICOLETE, V. C. et al. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 10, p. 1539–1546, 15 nov. 2016.
- NOULIN, F. et al. Cryopreserved Reticulocytes Derived from Hematopoietic Stem Cells Can Be Invaded by Cryopreserved *Plasmodium vivax* Isolates. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40798, 23 jul. 2012.
- NOULIN, F. et al. 1912–2012: a century of research on *Plasmodium vivax* in vitro culture. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 286–294, jun. 2013.
- NTUMNGIA, F. B. et al. Structural Analysis of the Synthetic Duffy Binding Protein (DBP) Antigen DEKnull Relevant for *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Design. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003644, 2015.
- NTUMNGIA, F. B. et al. A Novel Erythrocyte Binding Protein of *Plasmodium vivax* Suggests an Alternate Invasion Pathway into Duffy-Positive Reticulocytes. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–5, 7 set. 2016.
- NTUMNGIA, F. B. et al. An engineered vaccine of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13779, 23 dez. 2017.
- NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H. Design and Immunogenicity of a Novel Synthetic Antigen Based on the Ligand Domain of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 30–36, jan. 2012.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: An overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2010.
- ONDIGO, B. N. et al. Standardization and validation of a cytometric bead assay to assess antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* recombinant antigens. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 427, 21 dez. 2012.
- ONG, C. W. M. et al. Monkey Malaria in Humans: A Diagnostic Dilemma with

Conflicting Laboratory Data. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 927–928, 1 jun. 2009.

PARK, J.-W. et al. Naturally Acquired Antibody Responses to the C-Terminal Region of Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 1, p. 14–20, 1 jan. 2001.

PARWEEN, S.; GUPTA, P. K.; CHAUHAN, V. S. Induction of humoral immune response against PfMSP-119 and PvMSP-119 using gold nanoparticles along with alum. **Vaccine**, v. 29, n. 13, p. 2451–2460, 16 mar. 2011.

PAUL, A. S.; EGAN, E. S.; DURAISINGH, M. T. Host–parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. **Current Opinion in Hematology**, v. 22, n. 3, p. 220–226, maio 2015.

PERRAUT, R. et al. Comparative analysis of IgG responses to *Plasmodium falciparum* MSP1p19 and PF13-DBL1 α 1 using ELISA and a magnetic bead-based duplex assay (MAGPIX®-Luminex) in a Senegalese meso-endemic community. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 410, 17 dez. 2014.

PICKERING, J. W. et al. A Multiplexed Fluorescent Microsphere Immunoassay for Antibodies to Pneumococcal Capsular Polysaccharides. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 117, n. 4, p. 589–596, 1 abr. 2002a.

PICKERING, J. W. et al. Comparison of a Multiplex Flow Cytometric Assay with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitation of Antibodies to Tetanus, Diphtheria, and *Haemophilus influenzae* Type b. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 4, p. 872–876, jul. 2002b.

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

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

POPOVICI, J.; ROESCH, C.; ROUGERON, V. The enigmatic mechanisms by which *Plasmodium vivax* infects Duffy-negative individuals. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 2, p. e1008258, 20 fev. 2020.

PRIEST, J. W. et al. Integration of Multiplex Bead Assays for Parasitic Diseases into a National, Population-Based Serosurvey of Women 15-39 Years of Age in Cambodia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004699, 3 maio 2016.

PRIEST, J. W. et al. Specificity of the IgG antibody response to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* MSP119 subunit proteins in multiplexed serologic assays. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 417, 9 dez. 2018.

RANJAN, A.; CHITNIS, C. E. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 14067–14072, 23 nov. 1999.

RAWLINSON, T. A. et al. Structural basis for inhibition of *Plasmodium vivax* invasion

by a broadly neutralizing vaccine-induced human antibody. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1497–1507, 27 set. 2019.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 273, 4 dez. 2017.

RISCO-CASTILLO, V. et al. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 5, p. 593–603, nov. 2015.

ROCHA, M. V. et al. Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on Plasmodium vivax AMA-1 and MSP1 19. **Vaccine**, v. 35, n. 18, p. 2463–2472, abr. 2017.

RODRIGUES, M. H. C. et al. Serological detection of Plasmodium vivax malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malaria Journal**, v. 2, n. 1, p. 39, 14 dez. 2003.

RODRIGUES, M. H. C. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. **International Journal for Parasitology**, 2005.

ROGIER, E. et al. Multiple comparisons analysis of serological data from an area of low Plasmodium falciparum transmission. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 436, 4 dez. 2015.

RUSSELL, B. et al. A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by Plasmodium vivax. **Blood**, v. 118, n. 13, p. e74–e81, 29 set. 2011.

SALAVATIFAR, M. et al. Evaluation of Naturally Acquired Antibody Responses to Two Variant Forms of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen-1 in Individuals Living in Areas of Low and Unstable Malaria Transmission of Iran. **Archives of Iranian medicine**, v. 18, n. 12, p. 834–43, dez. 2015.

SAMPATH, S. et al. Glycan Masking of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein for Probing Protein Binding Function and Vaccine Development. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003420, 13 jun. 2013.

SANTOS, R. O. DOS et al. A First Plasmodium vivax Natural Infection Induces Increased Activity of the Interferon Gamma-Driven Tryptophan Catabolism Pathway. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. March, p. 1–13, 17 mar. 2020.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. [s.l.: s.n.].

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Dia mundial de luta contra a malária. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 15, p. 1–27, 2021.

SEIDEMAN, J.; PERITT, D. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100™ microsphere system. **Journal of Immunological Methods**, v. 267, n. 2, p. 165–171, set. 2002.

SETH, R. K. et al. Acquired immune response to defined Plasmodium vivax antigens in individuals residing in northern India. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 3, p. 199–206, mar. 2010.

SHAKRI, A. R.; RIZVI, M. M. A.; CHITNIS, C. E. Desenvolvimento de quantitativo receptor-ligand binding assay for use as a tool to estimate immune responses against

Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Region II. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 33, n. 4, p. 403–413, out. 2012.

SIDANA, R. et al. Prozone phenomenon in secondary syphilis. **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS**, v. 32, n. 1, p. 47, 2011.

SILVIE, O. et al. A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by Plasmodium falciparum Sporozoites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 9490–9496, 5 mar. 2004.

SINGH, K. et al. Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. **npj Vaccines**, v. 3, n. 1, p. 48, 28 dez. 2018.

SINGH, S. et al. Biochemical, Biophysical, and Functional Characterization of Bacterially Expressed and Refolded Receptor Binding Domain of Plasmodium vivax Duffy-binding Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17111–17116, maio 2001.

SINGH, S. K. et al. Definition of structural elements in Plasmodium vivax and P. knowlesi Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. **Biochemical Journal**, v. 374, n. 1, p. 193–198, 15 ago. 2003.

SOARES, I. S. et al. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infection and immunity**, v. 65, n. 5, p. 1606–14, maio 1997.

SOARES, I. S. et al. Antibody response to the N and C-terminal regions of the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of P.vivax malaria in the north of Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, n. 1, p. 13–24, jan. 1999a.

SOARES, I. S. et al. A Plasmodium vivax vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 5, n. 7, p. 459–70, 1 jul. 1999b.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1 19 expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from Pichia pastoris. **Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 237–246, 30 mar. 2002.

SOUSA, T. N. et al. 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**, v. 146, n. 2, p. 251–254, abr. 2006.

SOUSA, T. N. et al. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian Plasmodium vivax populations. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 334, 2010.

SOUZA-SILVA, F. A. et al. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93782, 7 abr. 2014.

SOUZA, J. M. et al. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 3, p. 357–363, 1 mar. 1999.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, 2006.

SURENDRA, H. et al. Analysis of serological data to investigate heterogeneity of malaria transmission: a community-based cross-sectional study in an area conducting elimination in Indonesia. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 227, 8 dez. 2019.

TAUIL, P. L. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. suppl 1, p. 105–106, ago. 2011.

TEBOH-EWUNGKEM, M. I.; NGWA, G. A. COVID-19 in malaria-endemic regions: potential consequences for malaria intervention coverage, morbidity, and mortality. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 5–6, jan. 2021.

THAM, W. H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. Plasmodium vivax vaccine research – we've only just begun. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2–3, p. 111–118, 2017.

TRIGLIA, T. et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 706–718, nov. 2000.

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

VAISHNAVI, G.; THULASIRAM, E. Relapse. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 8, n. october Spl Edition, p. 523–524, 25 out. 2015.

VANBUSKIRK, K. M. et al. Antigenic Drift in the Ligand Domain of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Confers Resistance to Inhibitory Antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1556–1562, nov. 2004.

VICENTIN, E. C. et al. Invasion-Inhibitory Antibodies Elicited by Immunization with Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen-1 Expressed in Pichia pastoris Yeast. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1296–1307, mar. 2014.

VLACHOU, D. et al. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. **Cellular Microbiology**, 2004.

VLACHOU, D. et al. **The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes** *Current Opinion in Genetics and Development*, 2006.

WANG, Q. et al. Naturally Acquired Antibody Responses to Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151900, 21 mar. 2016.

WEISS, D. J. et al. Indirect effects of the COVID-19 pandemic on malaria intervention coverage, morbidity, and mortality in Africa: a geospatial modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 59–69, jan. 2021.

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

WHITE, N. J. The rise and fall of long-latency Plasmodium vivax. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 4, p. 163–168, 1 abr.

2019.

WHO. Global technical strategy for malaria 2016-2030. **World Health Organization**, p. 1–35, 2015.

WHO. **World Malaria Report 2019**. [s.l: s.n.].

WHO. **World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges**. [s.l: s.n.].

WICKRAMARACHCHI, T. et al. Natural Human Antibody Responses to Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 under Low Transmission and Unstable Malaria Conditions in Sri Lanka. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 798–801, jan. 2006.

WOLLERSHEIM, S. K. et al. Serological Misdiagnosis of Acute Liver Failure Associated with Echovirus 25 Due to Immunological Similarities to Hepatitis A Virus and Prozone Effect. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 309–310, jan. 2015.

YANG, C. et al. Partial Protection against Plasmodium vivax Blood-Stage Infection in Saimiri Monkeys by Immunization with a Recombinant C-Terminal Fragment of Merozoite Surface Protein 1 in Block Copolymer Adjuvant. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 342–349, jan. 1999.

YAZDANI, S. et al. Immune Responses to Asexual Blood-Stages of Malaria Parasites. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p. 187–203, 1 mar. 2006.

YILDIZ ZEYREK, F. et al. Serologic Markers in Relation to Parasite Exposure History Help to Estimate Transmission Dynamics of Plasmodium vivax. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e28126, 29 nov. 2011.

YMAN, V. et al. Antibody acquisition models: A new tool for serological surveillance of malaria transmission intensity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19472, 5 maio 2016.

ZAKERI, S. et al. Anti-malarial seroprevalence assessment during an elimination programme in Chabahar District, south-eastern Iran. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 382, 22 dez. 2016.

ZIELER, H.; DVORAK, J. A. Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2002.

ZIMMERMAN, P. A. Plasmodium vivax Infection in Duffy-Negative People in Africa. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 636–638, 7 set. 2017.

Apêndice 1: Artigo



OPEN ACCESS

Edited by:

Bryce Chackerian,
University of New Mexico,
United States

Reviewed by:

Takafumi Tsuboi,
Ehime University, Japan
Martino Bardelli,
University of Oxford, United Kingdom

***Correspondence:**

Flora S. Kano
flora.kano@fiocruz.br
Luzia H. Carvalho
luzia.carvalho@fiocruz.br

[†]These authors share first authorship

[‡]These authors have contributed
equally to this work and share
senior authorship

Specialty section:

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

Received: 05 May 2021

Accepted: 13 September 2021

Published: 05 October 2021

Citation:

Alves JRS, de Araujo FF, Pires CV,
Teixeira-Carvalho A, Lima BAS,
Torres LM, Ntumngia FB, Adams JH,
Kano FS and Carvalho LH (2021)
Multiplexed Microsphere-Based Flow
Cytometric Assay to Assess Strain
Transcending Antibodies to
Plasmodium vivax Duffy Binding
Protein II Reveals an Efficient Tool to
Identify Binding-Inhibitory
Antibody Responders.
Front. Immunol. 12:704653.
doi: 10.3389/fimmu.2021.704653

Multiplexed Microsphere-Based Flow Cytometric Assay to Assess Strain Transcending Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Reveals an Efficient Tool to Identify Binding-Inhibitory Antibody Responders

Jéssica R. S. Alves^{1†}, Fernanda F. de Araújo^{2†}, Camilla V. Pires³, Andréa Teixeira-Carvalho², Barbara A. S. Lima¹, Letícia M. Torres¹, Francis B. Ntumngia³, John H. Adams³, Flora S. Kano^{1*‡} and Luzia H. Carvalho^{1*‡}

¹ Molecular Biology and Malaria Immunology, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Brazil, ² Integrated Research Group in Biomarkers, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Brazil, ³ Center for Global Health and Infectious Diseases Research, Department of Global Health, College of Public Health, University of South Florida, Tampa, FL, United States

Malaria remains a major public health problem worldwide, and *Plasmodium vivax* is the most widely distributed malaria parasite. Naturally acquired binding inhibitory antibodies (BIAbs) to region II of the Duffy binding protein (DBPII), a *P. vivax* ligand that is critical for reticulocyte invasion, are associated with a reduced risk of clinical malaria. Owing to methodological issues in evaluating antibodies that inhibit the DBPII–DARC interaction, a limited number of studies have investigated DBPII BIAbs in *P. vivax*-exposed populations. Based on the assumption that individuals with a consistent BIAb response are characterized by strain-transcending immune responses, we hypothesized that detecting broadly reactive DBPII antibodies would indicate the presence of BIAb response. By taking advantage of an engineered DBPII immunogen targeting conserved DBPII neutralizing epitopes (DEKnull-2), we standardized a multiplex flow cytometry-based serological assay to detect broadly neutralizing IgG antibodies. For this study, a standard *in vitro* cytoadherence assay with COS-7 cells expressing DBPII was used to test for DBPII BIAb response in long-term *P. vivax*-exposed Amazonian individuals. Taken together, the results demonstrate that this DBPII-based multiplex assay facilitates identifying DBPII BIAb carriers. Of relevance, the ability of the multiplex assay to identify BIAb responders was highly accurate when the positivity for all antigens

was considered. In conclusion, the standardized DBP-II-based flow cytometric assay confirmed that DBP-II-BIAb activity was associated with the breadth rather than the magnitude of anti-DBP-II antibodies. Altogether, our results suggest that multiplex detection of broadly DBP-II-reactive antibodies facilitates preliminary screening of BIAb responders.

Keywords: multiplex assay, inhibitory antibodies, Duffy binding protein, *Plasmodium vivax*, malaria

INTRODUCTION

In recent years, we have witnessed remarkably increased levels of global funding to combat malaria, which resulted in a significant reduction in the burden of the disease (1). Despite this, the WHO warned that the current progress in the global response to malaria had plateaued, and that key targets of the WHO's global malaria strategy would likely be missed (2). In particular, *Plasmodium vivax*, the most widespread human malaria parasite (3), poses challenges to control strategies, as this parasite is typically associated with low levels of parasitemia (4–6) and is able to transmit sexual-stage parasites before clinical manifestation (7, 8). Unlike *P. falciparum*, which may use several red blood cell invasion pathways (9), *P. vivax* infects human reticulocytes through a main pathway that requires interaction between an apical parasite protein, the Duffy binding protein (DBP), and its cognate reticulocyte receptor, the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) (10–12). While the receptor-binding domain of DBP (~350 amino acid residues known as region II, DBP-II) is the best-characterized and leading blood-stage vaccine candidate against *vivax* malaria (13), the malaria-exposed populations demonstrated DBP-II strain-specific immunity (14–16). However, among the same population, it is possible to find a small portion of a stable strain-transcending DBP-II inhibitory response (15, 17–19), which is associated with the presence of BIABs (20) and reduced risk of *P. vivax* clinical malaria (19, 21, 22). These findings suggest that a broadly reactive DBP-II inhibitory response should be pursued in all DBP-II-based vaccine strategies. In view of this, we recently demonstrated that a second-generation engineered DBP-II immunogen lacking most variant strain-specific epitopes (termed DEKnull-2) retained good immunogenicity and induced a broadly reactive BIAB response (20).

In vitro evaluation of DBP-II antibodies able to block *P. vivax* reticulocyte invasion has proven challenging, as short-term *P. vivax* blood-stage culture is not available for routine use in most malaria research laboratories (23). Consequently, different binding assay platforms have been used to estimate the effects of antibodies to inhibit the DBP-II-DARC interaction (24–26). The COS-7 erythrocyte-binding assay is a reference protocol based on the interaction between DBP-II expressed on the surface of transfected mammalian COS-7 cells and DARC-positive erythrocytes (27). As antibodies in the COS-7 assay face challenges in inhibiting highly multivalent cell interactions (i.e., DBP-II present on surface of COS-7 cells and DARC expressed by RBC), it has been suggested that small differences in antibody activity might not be detected (25). An alternative

platform is based on a lower affinity multimer-dimer interaction, in which recombinant DBP-II interacts with a DARC-Fc recombinant protein (24, 25). While an assay based on the recombinant DARC-protein seems to be more amenable to high-throughput analysis, an assay with low valency interaction may overestimate inhibitory activity. Even so, *in vitro*-binding assays have greatly contributed to the study of naturally acquired antibody responses able to block the interaction between DBP-II and DARC (17–21, 28).

Considering the limitations of routine evaluations of antibodies targeting DBP-II-DARC interaction, the rationale was to develop a more “friendly” assay that indicates the presence of BIABs. As a consistent BIAB response is characterized by DBP-II strain-transcending immunity, we hypothesized that simultaneous detection of antibodies against genetically distinct DBP-II variants would increase the chances of identifying individuals with BIAB-specific response. In addition to including highly prevalent DBP-II variants circulating in the Amazon region, the advantage of our assay was to include a second generation of engineered DBP-II immunogen lacking strain-specific epitopes (termed DEKnull-2), whose reactivity was previously associated with broadly reactive BIAB response (20). Using the multiplex assay, it was possible to demonstrate that the specificities to multiple DBP-II variants (“breadth”) rather than the magnitude of anti-DBP-II antibodies, correlated with BIAB response.

MATERIAL AND METHODS

DBP-II-Specific Monoclonal Antibodies and Panel of Samples

DBP-II Monoclonal Antibodies

Two specific DBP-II monoclonal antibodies (mAbs) were used to evaluate the ability of the multiplex assay to assess DBP-II target epitopes. The 2D10 inhibitory mAb targets disulfide-bonded epitopes, which are critical for the maintenance of the native conformation required for erythrocyte receptor recognition in DBL domains (29, 30). The noninhibitory 3D10 mAb recognizes both denatured and refolded antigens (29).

Pooled Plasma Samples

To standardize the multiplexed microsphere-based flow cytometric assay, three types of pooled plasma samples were prepared: (i) DBP-II-positive plasma pools obtained from individuals naturally exposed to *P. vivax* who had high levels of anti-DBP-II antibody responses as characterized by the presence of

BIAb activity (>90% of inhibition in the COS-7 cells) and ELISA-detected antibodies (reactive index >5 for different DBPII constructions); each positive pool included four individual samples; (ii) DBPII-negative pools from malaria endemic area, which were selected from individuals (four samples per pool) living in an endemic area (Amazon Basin) but with no detectable DBPII antibody response (negatives for BIABs and ELISA); and (iii) DBPII-negative pools from individuals living in a nonendemic area of malaria (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and who have never been exposed to malaria transmission (negative pool nonendemic area).

***P. vivax* Plasma Samples**

To evaluate the DBPII-multiplexed microsphere-based flow cytometric assay, the study included a total of 245 samples from 85 long-term *P. vivax*-exposed Amazonian individuals. The clinical, immunological, and epidemiological characteristics of the study population have been previously described (31). Briefly, the studied individuals were adults with a similar proportion of males to females (0.95:1), who had been living in the Amazon area for an average of 35 years (IQR: 24–50). As these individuals were Amazonian natives, their age basically corresponds to the time of exposure to malaria (median age, 43 years; IQR: 29–54). Consequently, most individuals did not have circulating parasites (as detected by microscopy or PCR-based assays), and *P. vivax* malaria infection was detected only in two out of 85 (2%) of them (asymptomatic infections).

The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the Research Institute René Rachou (Report No. 007/2006, No. 07/2009, No. 12/2010, No. 26/2013, and CAAE 50522115.7.0000.5091). The current study was conducted according to the laboratory biosafety and biosecurity policy guidelines of the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazilian Ministry of Health (http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/manuais/biosseg_manuais.html).

Recombinant DBPII Antigens

The recombinant *P. vivax* DBPII used in this study included amino acids 243–573 of the Sal-1 reference strain (32) and from Brazil-1 (Brz-1), a highly prevalent DBPII variant circulating in the Amazon area (33), and DEKnull-2 (20, 34). All proteins were expressed as 39 kDa 6× His fusion proteins in *Escherichia coli*, as previously described (20, 35).

ELISA-Detected Antibody Response

A conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen-specific IgG antibody response was carried out as previously described (36, 37) with plasma samples diluted at 1:100 and DBPII recombinant proteins used at a final concentration of 3 µg/ml. For each protein, the results were expressed as the ELISA reactivity index (RI), calculated as the ratio of the mean optical density (OD₄₉₂) of each sample to the mean OD plus three standard deviations of samples from 20 to 30 unexposed volunteers. RI values >1.0 were considered positive.

Coupling Beads and Flow Cytometry Assay

The protocol described here was based on a multiplexed microsphere-based flow cytometric assay using the BD™ CBA Human Soluble Protein Flex Set System (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). This assay provides a method of capturing a set of analytes with beads of known size and fluorescence, allowing the coupling of different antigens to beads with different positions to create a multiplex assay. Here, functional beads (BD Biosciences) were coupled to *P. vivax* recombinant proteins according to the manufacturer's protocol. Briefly, functional beads were incubated with dithiothreitol (1 M) for 1 h at room temperature. The beads were then washed and resuspended in a coupling buffer (BD Biosciences). Next, recombinant DBPII Sal-1, DBPII Brz-1, or DEKnull-2 at 1 mg/ml were activated by incubation with sulfo-succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate for 1 h. Next, the activated protein was added to the beads and allowed to conjugate for 1 h at room temperature. *N*-Ethylmaleimide (2 mg/ml) was added, and the mixture was incubated for 15 min. The beads were then washed and resuspended in storage buffer (BD Biosciences). For assessment of antibody responses, 1 µl of coupled beads were washed and incubated with plasma diluted in 100 µl of washing buffer for 2 h. The unbound antibodies were washed off and then incubated with a biotin-goat anti-human IgG antibody (A18815, Invitrogen, Waltham, MA, USA) and streptavidin-PE (554061, BD Biosciences). Simplex titration assay was performed to determine the best plasma sample dilution using twofold serial dilutions (starting at 1:50) was used in the test. Samples were acquired using a FACSVerse cytometer (Becton Dickinson) equipped with three lasers (405, 488, and 640 nm) capable of distinguishing the flex set of beads through the CBA Red and CBA NIR bead channels. The detection reagent was a phycoerythrin (PE)-conjugated antibody (A18815; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), which provides a fluorescent signal in proportion to the amount of bound antibodies (reporter channel PE). Antibody response was determined by obtaining the median fluorescence intensity (MFI) values using the FlowJo program (version 10.4.1.), following the analysis strategy described in **Figure S1**. Briefly, the microspheres were selected based on their morphometric features (forward scattering (FSC) and side scattering (SSC)). Next, the CBA-NIR and CBA-Red channels were selected to discriminate each bead population based on the fluorometric profiles. The MFI was determined in each population by selecting histograms of Comp-PE, wherein the *x*-axis represents the intensity of secondary staining. The exact value of MFI was obtained by selecting the statistical features of MFI and Comp-PE.

DBPII-Transfected COS-7 Cells and Erythrocyte-Binding Assay

The functional properties of DBPII antibodies (BIABs) were assessed using COS-7 cell erythrocyte binding assays, as previously described (17, 26, 28). Briefly, COS-7 cells (green

monkey kidney epithelium; ATCC, Manassas, VA, USA) were transfected with the plasmid pEGFP-DBP_{II} Brz-1 (common DBP_{II} allele/variant circulating in the Amazon area) (33) using Lipofectamine and PLUS reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, COS-7 cells were seeded in a six-well culture plate (1.5×10^5 cells/well) were transfected with the plasmid (0.5 μ g/well) liposome complexes (5% Plus-reagent and 3% lipofectamine) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) without fetal bovine serum (Gibco-BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA). After 6 h of exposure to the DNA-liposome complexes (37°C, 5% CO₂), the transfection medium was replaced with DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Twenty-four hours after transfection, the culture medium was replaced again, and the efficiency of transfection was assessed using an inverted fluorescence microscope (Nikon TE2000E, Melville, NY, USA). Forty-eight hours post-transfection, erythrocyte-binding assays were performed as previously described (26). Plasma samples at 1:40 dilution in DMEM without fetal bovine serum were added to plates with transfected COS-7 cells transfected, and plates were incubated for 1 h at 37°C in 5% CO₂. Human erythrocytes O⁺ DARC⁺ (genotype Fy^aA/Fy^bB) in a 10% suspension were added to each well (200 μ l/well), and the plates were incubated for 2 h at room temperature. After incubation, unbound erythrocytes were removed by washing the wells three times with DMEM medium without fetal bovine serum. Binding was quantified by counting rosettes around GFP-positive cells within 10 fields of view ($\times 200$). Binding for each plasma dilution was compared with the binding of transfected COS-7 cells incubated with negative control plasma at a 1:40 dilution (100% binding). The percent inhibition was calculated as $100 \times (R_c - R_t)/R_c$, where R_c is the average number of rosettes in the control wells and R_t is the average number of rosettes in the test wells. Percent inhibition values were considered positive at >50%. Samples were classified as high responders (HR) when the percentage inhibition values were >90%.

Statistical Analysis

A database was created using Epidata software (version V2.2.2.183, <http://www.epidata.dk>). Graphics and analyses were performed using GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com) and R statistical software (version 3.3.2). Differences in means and medians were tested using either one-way ANOVA, with Tukey's *post-hoc* test, the Mann-Whitney test, or Kruskal-Wallis test, with Dunn's *post-hoc* test, as appropriate. The performance parameters were defined using a 2×2 contingency table with 95% confidence intervals (95% CI), calculated using the OpenEpi open-source statistical calculator (openepi.com, Version 3) (38). The performance of the multiplex serological assay was expressed by statistical indices using the results of COS-7 cell erythrocyte binding assays as a reference (gold standard for BIAb response): (i) sensitivity = [true positives/(true positives + false negatives)] $\times 100$; (ii) specificity = [true negatives/(true negatives + false positives)] $\times 100$; (iii) accuracy = [true positives + true negatives/(all sample tests)]. The logistic regression model, followed by odds ratio calculations, with a confidence interval of 95%, was built to describe

independent associations between the presence of inhibition by BIABs and seropositivity against none, one, two, or three recombinant proteins as confounding variables. The dependent variables (BIAB response) of the models were the binary values, where all positive and negative responses were considered "1" and "0," respectively. To compare the performance between simplex and multiplex versions of multiplexed microsphere-based flow cytometric assays, receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed using GraphPad Software. True positive and negative samples were defined according to the presence or absence of BIAB activity, respectively, as determined by the reference methods of the COS7-cell cytoadherence assay (gold standard). The ability of the test to distinguish between positive and negative results was evaluated using the area under the curve (AUC; measure of accuracy).

RESULTS

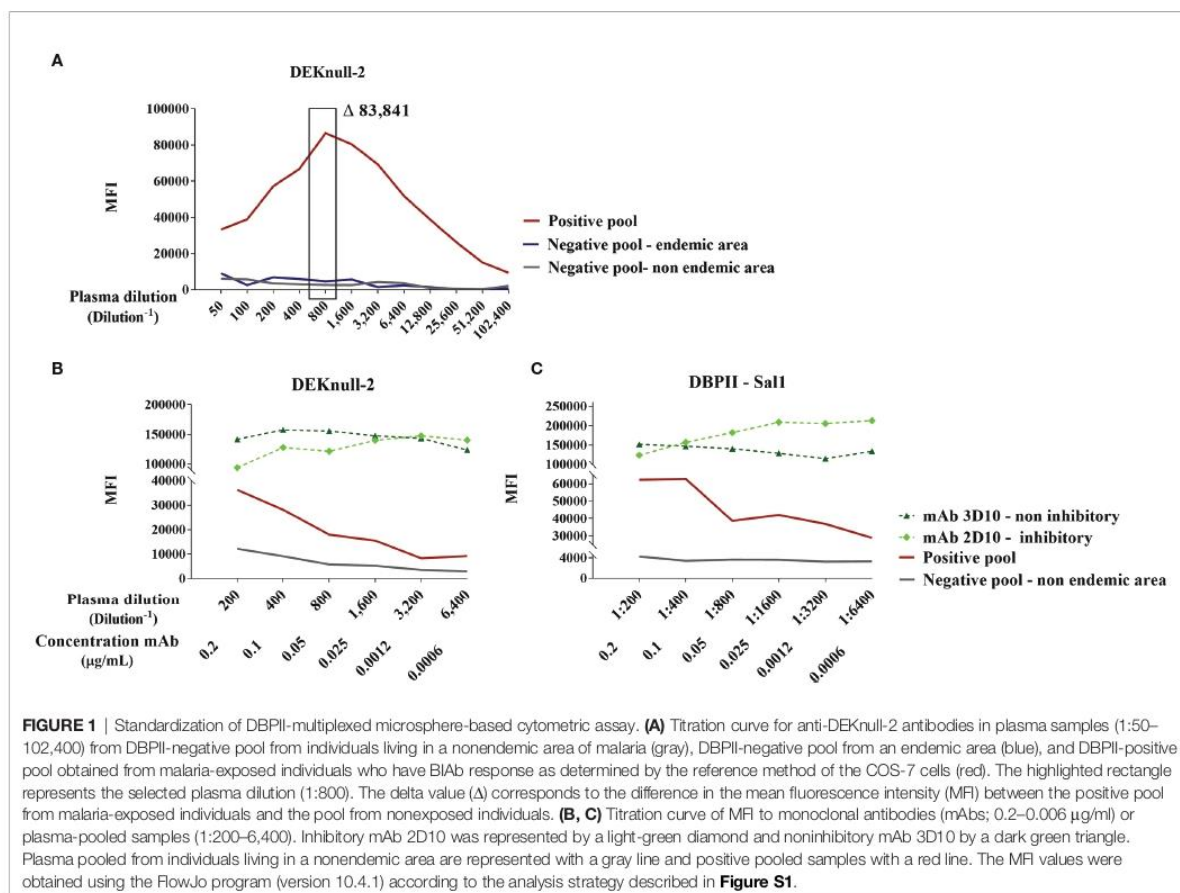
Standardization of DBP_{II}-Multiplexed Microsphere-Based Cytometric Assay

To confirm the coupling of antigens and the ideal conditions to differentiate positive and negative samples in the flow cytometry-based DBP_{II} assay, we first carried out a pilot assay, in which each recombinant protein was evaluated with serial dilutions of well-characterized positive and negative pooled samples. Based on the titration curve of DEKnull-2 (Figure 1A), a 1:800 plasma dilution was chosen as the best dilution to discriminate between positive and negative responses. At the same dilution, significant differences between positive and negative pooled samples were also obtained for DBP_{II} Sal-1 (10–11 times) and DBP_{II} Brz-1 (three to four times) (Figure S2), which allowed the multiplex assays to be performed using a single plasma dilution.

As recombinant DBP_{II} proteins were covalently bound to beads, we further assessed the availability of surface-exposed epitopes using two DBP_{II}-specific mAbs, including one (mAb 2D10) that recognizes DBP_{II} conformational inhibitory epitopes. Titration of both mAbs (2D10 and 3D10) demonstrated that the process of covalent coupling of the DEKnull-2 (Figure 1B) or native DBP_{II} variants (e.g., Sal-1; Figure 1C) to the beads did not interfere with the recognition of DBP_{II}-exposed epitopes, including those recognized by the 2D10 mAb.

Evaluation of *P. vivax* Plasma Samples in the DBP_{II}-Based Multiplex Flow Cytometry Assay

For this purpose, plasma samples from the study participants were screened for anti-DBP_{II} antibodies using both conventional ELISA and DBP_{II}-transfected COS-7 cell assay. For the first round of multiplex assays, we selected two subgroups of malaria-exposed individuals (Table S1): (i) HR ($n = 21$) who presented with high levels of DBP_{II} antibodies as detected by ELISA (reactivity index ranged 4–22, median 12.10) and BIAB activity (>90% of binding inhibition); (ii) nonresponders from the endemic area (NR, $n = 42$), whose DBP_{II}-specific antibodies (detected by ELISA and BIABs) were undetectable. In addition, a subgroup of individuals living



outside the endemic area and those with undetectable DBPII-specific antibodies were included (nonexposed (NE), $n = 13$). Regardless of the DBPII antigens used in the multiplex assay, the results confirmed that the HR subgroup was clearly discriminated from the NE and NR subgroups (**Figure 2**). For DEKnull-2, the average response of the HR group, as evaluated by mean of fluorescence (MFI), was roughly 38–64 times greater than those of the nonresponder groups (NR and NE, respectively) (Dunn's test, $p < 0.05$ for all antigens) (**Figure 2**; **Table S2**).

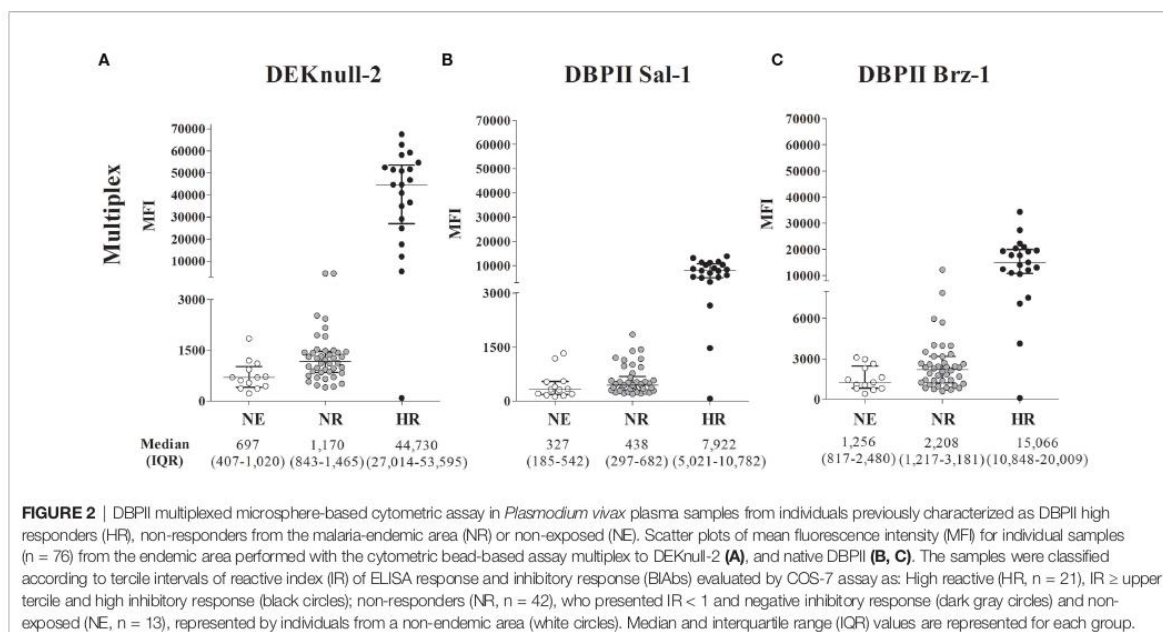
The ROC curves confirmed comparable results between the simplex and multiplex versions of the assay (**Figure S3**), with the ability to distinguish between positive and negative results, with AUC >80% for simplex and >90% for multiplex. More specifically, the minimum differences between the HR subgroup and NE/NR in the simplex version were 18 times for DEKnull-2 and approximately eight times for DBPII Brz-1 or DBPII Sal-1 (**Table S2**).

Breadth of DBPII IgG Antibody Response in Multiplex Assay and BIAb Response

To assess the specificities of detected antibodies for multiple DBPII constructs, a panel of 245 plasma samples from

individuals naturally exposed to *P. vivax* was screened for the presence of DBPII-specific antibodies by the multiplex flow cytometry assay. A total of 95 out of 245 (39%) samples were positive for at least one DBPII construct. A Venn diagram showed that a significant number of samples were positive for all assayed antigens (42/95, 44%) (**Figure 3**), confirming the detection of broadly reactive DBPII antibodies. Considering the positivity of each recombinant protein, a high response was detected for DEKnull-2 (34/95, 36%).

To evaluate whether a positive DBPII-multiplex assay would be indicative of the presence of BIAb activity, the abovementioned panel of 245 plasma samples was blindly screened by COS-7 cell erythrocyte-binding assays (**Table S3**). The results demonstrated that 31% (76/245) of the samples presented BIAb activity. Logistic regression models demonstrated that the probability of the DBPII-multiplexed microsphere-based assay to correctly identify the BIAb response increased with the number of antigens recognized in the multiplex assay. Thus, positivity for all three recombinant proteins increased by about 12 times the chances of identifying the BIAb response (OR = 12.95, 95% CI = 2.76–60.59, $p < 0.001$) (**Figure 4**).



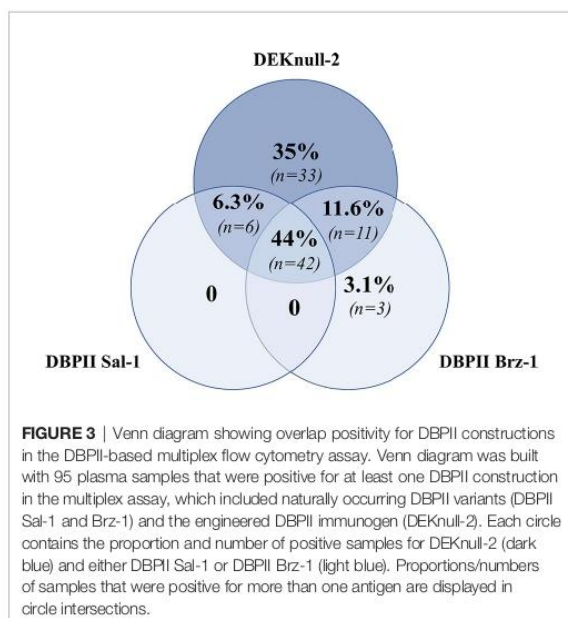
As the ability of the DBP_{II}-multiplex assay to identify BIAB responses depended on the number of antigens recognized in the assay, we evaluated the performance of the multiplex assay when identifying BIAB carriers considering the positivity for any antigen (Figure S4) as well as for the three antigens assayed in the present study (Table S1). The accuracy (AUC) of the

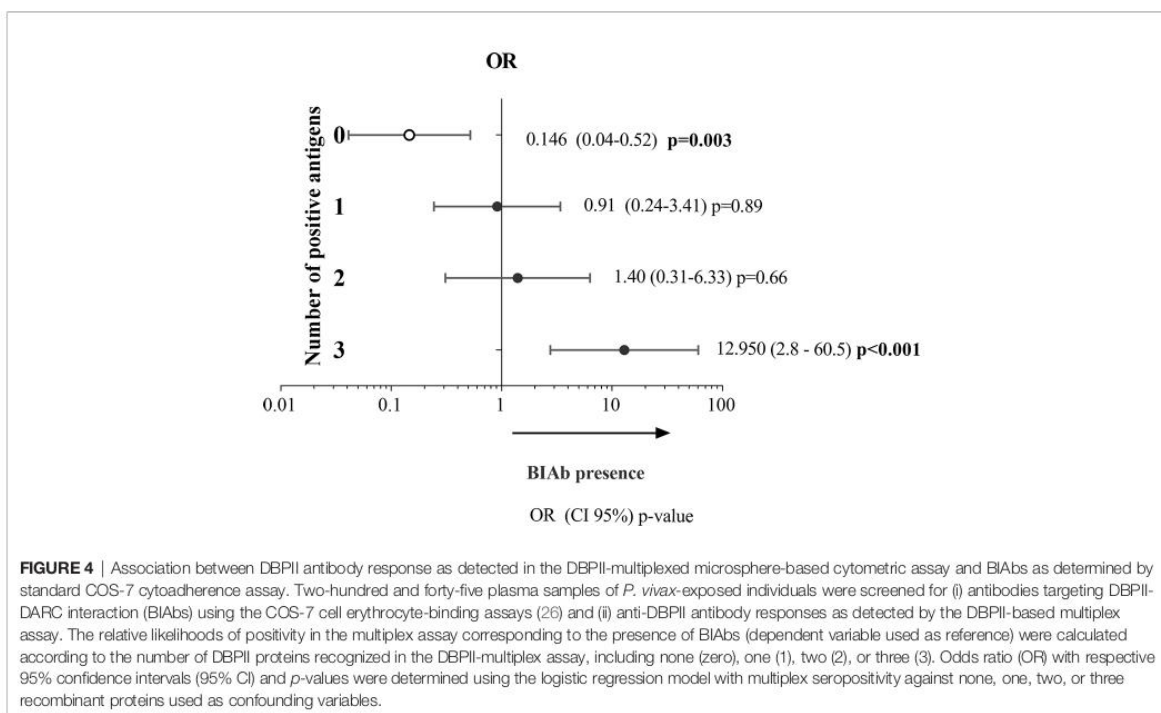
multiplex assay was higher when the positivity for all antigens was considered (0.90 vs. 0.80), particularly because of an increase in specificity (80% to 97%).

DISCUSSION

Plasmodium vivax DBP_{II}-based vaccines aim to induce broadly neutralizing antibody responses that are able to block merozoite invasion of human reticulocytes (39–41). Although few naturally exposed individuals develop high titers of strain-transcending inhibitory anti-DBP_{II} antibodies (17, 42), these inhibitory antibodies are associated with clinical protection (19, 21). While an *in vitro* DBP_{II} antibody functional assay is an important tool to guide DBP_{II} vaccine development, the detection of DBP_{II} BIABs in malaria-exposed human populations has been largely restricted (17, 18, 20, 21, 43), perhaps due to the limitation of conducting the current functional assays in the context of larger prospective patient cohorts.

Here, we aimed to develop a conventional multiplex flow cytometry-based serological assay that would indicate the presence of BIABs as detected by the well-established COS-7 cell transfection-based assay (44). The rationale behind our study was that a simplified methodology to identify potential BIAB carriers would reduce the number of more complex functional assays required to confirm the presence of inhibitory antibodies. The apparent consensus is that multiplex serological assays have advantages in terms of execution time, automation, allowing the use of reduced amounts of biological sample (45). They have been important tools for the simultaneous detection of antibodies against multiple antigens in population-based





serological surveys (46–48), especially when vulnerable populations are involved, and a minimal amount of blood should be obtained.

In the simplex version of the DBP-II-multiplexed microsphere-based cytometric assay, titration experiments confirmed that this assay correctly differentiated samples showing DBP-II-binding activity. In addition, it was possible to suggest that the process of coupling beads does not interfere with the exposure of conformational DBP-II epitopes, as both inhibitory (2D10) and noninhibitory (3D10) DBP-II mAbs were correctly recognized. This is particularly relevant as the crystal structure of the DBP-II/2D10 complex showed that 2D10 targets disulfide bond-dependent DBP-II epitopes, which are critical for the maintenance of the native conformation of proteins required for DARC recognition (30). Although a single inhibitory monoclonal antibody was used as a control in our experiments, the 2D10 mAb can bind divergent DBP alleles (30); in particular, the same authors demonstrated that the 2D10 epitopes were invariant in more than 90% of the DBP sequences representing global diversity (49), which confirms that this mAb recognizes broadly conserved epitopes. Furthermore, groups of well-characterized DBP-II responders (i.e., HR, NR, and NE) allowed us to assess the antibody response to different DBP-II variants in a multiplex format assay. Taken together, using a minimum number of plasma samples, this multiplex detection corroborates previous reports showing the feasibility of multiplex detection of malaria antibody responses against different allelic variants of the same antigen (50, 51).

To investigate whether the DBP-II-multiplexed microsphere-based cytometric assay would be indicative of the presence of BIAB activity, we used the COS-7 cell erythrocyte-binding assays to screen a panel of *P. vivax* samples for the presence of antibodies targeting DBP-II-DARC interaction. The results demonstrate that the ability of the DBP-II-based multiplex assay to correctly identify BIAB activity was associated with the detection of antibodies against both conserved (DEKnull-2) and polymorphic DBP-II epitopes (Sal-1 plus Brz-1). Indeed, the odds ratio (OR) statistic showed that positivity for all three recombinant proteins in the multiplex assay increased the chances of identifying BIAB carriers by about 12 times. The accuracy of the multiplex assay to identify BIAB carriers was 90% when multiplex positivity took into account all three antigens. In our multiplex assay protocol, the results demonstrated that the “breadth,” (i.e., the specificities for multiple DBP-II variants) rather than the levels of DBP-II-based antibodies, was related to the presence of BIABs. Considering that BIABs activity is associated with strain-transcending inhibitory immune responses, we can assume that the detection of anti-DBP-II antibodies against a range of diverse allelic DBP-II variants seems to be more relevant than levels of the antibody *per se* in our multiplex assay. In this scenario, it would be interesting to explore whether the inclusion of additional antigens involved in the reticulocyte invasion would increase the chance of detecting BIABs; for example, the *P. vivax* reticulocyte-binding protein (PvRBPs) family that are involved in novel reticulocyte invasion pathways (52–54). Also, a distinct erythrocyte-binding protein

(EBP2), a new member of the DBP family, which may represent a novel ligand for an alternative pathway of DARC-positive reticulocyte invasion (55).

Remarkably, while Sal-1 and Brz-1 are highly prevalent DBP-II variants circulating in the study area (31, 33, 49), we observed a predominance of response to DEKnull-2 over these DBP-II-strain-specific antigens. This was not unexpected, as we have previously demonstrated that while antibody responses to DBP-II-strain-specific antigens (such as Sal-1 and Brz-1) could be influenced by seasonal variation in malaria transmission (37), the immune response towards the conserved epitopes present in DEKnull-2 was stable and indicative of naturally acquired immunity (56). Consequently, it seems reasonable to speculate that some degree of *P. vivax*-acquired immunity was naturally acquired in the studied individuals with high BIAb activity (>90% as detected here with COS-7 cells). Nevertheless, evaluating the protective nature of the antibody response was outside the scope of the current study. To properly address the clinical protection mediated by BIABs, a long-term follow-up study is required with an estimated sample size that allows statistical power. Despite this, different studies have already confirmed the association between clinical protection and the presence of BIAB responses (15, 21, 22), including in the Brazilian Amazon area (19).

The current study has limitations that should be taken into account when interpreting the results. First, we did not use purified DBP-II IgG antibodies to confirm IgG binding to the beads. However, we used dose-response curves of well-characterized BIAB plasma samples (positive and negative) that confirmed the specificity of the assay using different concentrations of highly specific antihuman IgG conjugate. Of relevance, we previously used confocal microscopy to confirm that BIAB-positive plasma samples are characterized by high levels of IgG antibodies targeting DBP-II-DARC interaction (28). Furthermore, we titrated two IgG DBP-II-specific mAbs. Consequently, we are confident about the specificity of the assay for detecting DBP-II IgG antibodies. However, to adapt this protocol to a semiautomated multiplex high-throughput assay, additional assay parameters should be evaluated, including the stability of antigen coupling after different storage conditions, and controls that suffer less from interassay variations such as purified/mono- or polyclonal antibodies. Second, the DBP functional assay used here only demonstrates the inhibition of DBP-DARC binding, but not the most desirable *in vitro* assay available, which is the invasion of human reticulocytes by *ex vivo* *P. vivax* isolates. We previously used a short-term *ex vivo* *P. vivax* cultures to demonstrate that anti-DEKnull-2 antibodies were able to inhibit merozoite invasion of human reticulocytes (20). Nevertheless, we agree with others that the interpretation of DBP-II-DARC-binding assays should be approached with caution. In 2019, Rawlinson et al. (57) demonstrated that some human DBP-II mAbs able to block parasite invasion were ineffective at blocking the DBP-II-DARC interaction in a protein-protein assay (binding-inhibition ELISA) (57). While these authors used a protein-protein assay that only uses fragments of DARC, we used the established COS-7 cytoadherence assay based on cell-cell multivalent interaction.

At this point, we can speculate that a cell-cell interaction assay may be more realistic for evaluating inhibitory antibody response in a protein-protein assay. Although all *in vitro* functional assays present limitations, DBP-II-DARC interaction-based assays were decisive in confirming *P. vivax* clinical immunity mediated by anti-DBP antibodies (15, 19, 21, 22).

In conclusion, the successful protocol described here indicates that a multiplex detection of broadly DBP-II-reactive antibodies is a potential approach that could be useful to improve the detection of BIAB carriers in large-population cohort studies. For that, it is essential to adapt the multiplex platform to include allelic DBP-II variants prevalent in the study area.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by The Ethical Committee of Research on Human Beings from the Rene Rachou Institute – Fiocruz Minas (Reports No. 007/2006, No. 07/2009, No.12/2010, No. 26/2013, and CAAE 50522115.7.0000.5091), according to the Brazilian National Council of Health. The study participants were informed about the aims and procedures and agreed with voluntary participation through written informed consent. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and study design: JA, AT-C, FK, and LC. Fieldwork and recruitment of participants: JA, BL, LT, CP, and FK. Performance of experiments and data analysis: JA, FA, and CP. The drafting of the manuscript: LC, FK, CP, and JA. Provide critical advice and reagents: FN and JA. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the National Research Council for Scientific and Technological Development-CNPq (422257/2016-8 by LC), the Research Foundation of Minas Gerais-FAPEMIG (APQ-02625-15 by LC), Programa Fiocruz de Fomento à Inovação: Inova Fiocruz (VPPCB-007-FIO-18-2-33 by FK), and the NIH Research Project Grant Program (R01AI064478 by JA and LC). LC and AT-C are research fellows from CNPq and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Finance Code 001). Scholarships were

sponsored by CAPES (BASL, JRSA) and CNPq (LC, FA, CP, and LT). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the inhabitants of the Rio Pardo community for their enthusiastic participation in the study and the local malaria control team in Presidente Figueiredo (Amazonas State) for their logistic

support and the units of Fundação Oswaldo Cruz in Manaus, AM (Fiocruz Amazonia), and Belo Horizonte, MG (Fiocruz Minas), for overall support. The Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use in cytometry platforms.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.704653/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Smith RD, Keogh-Brown MR, Chico RM, Bretscher MT, Drakeley C, Jensen HT. Will More of the Same Achieve Malaria Elimination? Results From an Integrated Macroeconomic Epidemiological Demographic Model. *Am J Trop Med Hyg* (2020) 103:1871–82. doi: 10.4269/ajtmh.19-0472
- WHO. *World Malaria Report 2020: 20 Years of Global Progress and Challenges*. Geneva: World Health Organization(2020). doi: 978-92-4-001579-1.
- Battle KE, Lucas TCD, Nguyen M, Howes RE, Nandi AK, Twohig KA, et al. Mapping the Global Endemicity and Clinical Burden of Plasmodium Vivax, 2000–17: A Spatial and Temporal Modelling Study. *Lancet* (2019) 394:332–43. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31096-7
- Harris I, Sharrock WW, Bain LM, Gray K-A, Bobogare A, Boaz L, et al. A Large Proportion of Asymptomatic Plasmodium Infections With Low and Sub-Microscopic Parasite Densities in the Low Transmission Setting of Temotu Province, Solomon Islands: Challenges for Malaria Diagnostics in an Elimination Setting. *Malar J* (2010) 9:254. doi: 10.1186/1475-2875-9-254
- Cheng Q, Cunningham J, Gattton ML. Systematic Review of Sub-Microscopic P. Vivax Infections: Prevalence and Determining Factors. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) 9(1):e3413. doi: 10.1371/journal.pntd.0003413
- Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key Gaps in the Knowledge of Plasmodium Vivax, a Neglected Human Malaria Parasite. *Lancet Infect Dis* (2009) 9:555–66. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70177-X
- McKenzie FE, Jeffery GM, Collins WE. Plasmodium Vivax Blood-Stage Dynamics. *J Parasitol* (2006) 88:521–35. doi: 10.2307/3285442
- Ong KIC, Kosugi H, Thoen S, Araki H, Thandar MM, Iwagami M, et al. Systematic Review of the Clinical Manifestations of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in the Greater Mekong Subregion: Implications for Malaria Elimination and Beyond. *BMJ Glob Heal* (2017) 2:e000415. doi: 10.1136/bmjgh-2017-000415
- Paul AS, Egan ES, Duraisingh MT. Host–parasite Interactions That Guide Red Blood Cell Invasion by Malaria Parasites. *Curr Opin Hematol* (2015) 22:220–6. doi: 10.1097/MOH.0000000000000135
- Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A Family of Erythrocyte Binding Proteins of Malaria Parasites. *Proc Natl Acad Sci* (1992) 89:7085–9. doi: 10.1073/pnas.89.15.7085
- Chitnis CE, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH. The Domain on the Duffy Blood Group Antigen for Binding Plasmodium Vivax and P. Knowlesi Malarial Parasites to Erythrocytes. *J Exp Med* (1996) 184:1531–6. doi: 10.1084/jem.184.4.1531
- Barnwell JW, Galinski MR. Plasmodium Vivax: A Glimpse Into the Unique and Shared Biology of the Merozoite. *Ann Trop Med Parasitol* (1995) 89:113–20. doi: 10.1080/00034983.1995.11812941
- De SL, Ntumngia FB, Nicholas J, Adams JH. Progress Towards the Development of a P. Vivax Vaccine. *Expert Rev Vaccines* (2021) 20:97–112. doi: 10.1080/14760584.2021.1880898
- Ceravolo IP, Sanchez BAM, Sousa TN, Guerra BM, Soares IS, Braga EM, et al. Naturally Acquired Inhibitory Antibodies to Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein Are Short-Lived and Allele-Specific Following a Single Malaria Infection. *Clin Exp Immunol* (2009) 156:502–10. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03931.x
- Cole-Tobian JL, Michon P, Biasor M, Richards JS, Beeson JG, Mueller I, et al. Strain-Specific Duffy Binding Protein Antibodies Correlate With Protection Against Infection With Homologous Compared to Heterologous Plasmodium Vivax Strains in Papua New Guinean Children. *Infect Immun* (2009) 77:4009–17. doi: 10.1128/IAI.00158-09
- Xainli J, Cole-Tobian JL, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Yazdani SS, et al. Epitope-Specific Humoral Immunity to Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein. *Infect Immun* (2003) 71:2508–15. doi: 10.1128/IAI.71.5.2508-2515.2003
- Souza-Silva FA, Torres LM, Santos-Alves JR, Tang ML, Sanchez BAM, Sousa TN, et al. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBP-II) Immunity. *PLoS One* (2014) 9:e93782. doi: 10.1371/journal.pone.0093782
- Kano FS, Souza-Silva FA, Torres LM, Lima BAS, Sousa TN, Alves JRS, et al. The Presence, Persistence and Functional Properties of Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10:e0005177. doi: 10.1371/journal.pntd.0005177
- Nicolette VC, Frischmann S, Barbosa S, King CL, Ferreira MU. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. *J Infect Dis* (2016) 214:1539–46. doi: 10.1093/infdis/jiw407
- Ntumngia FB, Pires CV, Barnes SJ, George MT, Thomson-Luque R, Kano FS, et al. An Engineered Vaccine of the Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein Enhances Induction of Broadly Neutralizing Antibodies. *Sci Rep* (2017) 7:13779. doi: 10.1038/s41598-017-13891-2
- King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanic D, Zimmerman PA, et al. Naturally Acquired Duffy-Binding Protein-Specific Binding Inhibitory Antibodies Confer Protection From Blood-Stage Plasmodium Vivax Infection. *Proc Natl Acad Sci* (2008) 105:8363–8. doi: 10.1073/pnas.0800371105
- He W, Shakri AR, Bhardwaj R, França CT, Stanic DI, Healer J, et al. Antibody Responses to Plasmodium Vivax Duffy Binding and Erythrocyte Binding Proteins Predict Risk of Infection and Are Associated With Protection From Clinical Malaria. *PLoS Negl Trop Dis* (2019) 13:e0006987. doi: 10.1371/journal.pntd.0006987
- Armistead JS, Adams JH. Advancing Research Models and Technologies to Overcome Biological Barriers to Plasmodium Vivax Control. *Trends Parasitol* (2018) 34:114–26. doi: 10.1016/j.pt.2017.10.009
- Shakri AR, Rizvi MMA, Chitnis CE. Development of a Quantitative Receptor-Ligand Binding Assay for Use as a Tool to Estimate Immune Responses Against Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein Region II. *J Immunoassay Immunochem* (2012) 33:403–13. doi: 10.1080/15321819.2012.659781
- Sampath S, Carrioco C, Janes J, Gurumoorthy S, Gibson C, Melcher M, et al. Glycan Masking of Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein for Probing Protein Binding Function and Vaccine Development. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003420. doi: 10.1371/journal.ppat.1003420
- Michon P, Fraser T, Adams JH. Naturally Acquired and Vaccine-Elicited Antibodies Block Erythrocyte Cytoadherence of the Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein. *Infect Immun* (2000) 68:3164–71. doi: 10.1128/IAI.68.6.3164-3171.2000
- Chitnis CE, Miller LH. Identification of the Erythrocyte Binding Domains of Plasmodium Vivax and Plasmodium Knowlesi Proteins Involved in Erythrocyte Invasion. *J Exp Med* (1994) 180:497–506. doi: 10.1084/jem.180.2.497

28. Ceravolo IP, Souza-Silva FA, Fontes CJF, Braga EM, Madureira AP, Krettl AU, et al. Inhibitory Properties of the Antibody Response to Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein in an Area With Unstable Malaria Transmission. *Scand J Immunol* (2008) 67:270–8. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02059.x
29. Ntumngia FB, Schloegel J, Barnes SJ, McHenry AM, Singh S, King CL, et al. Conserved and Variant Epitopes of Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein as Targets of Inhibitory Monoclonal Antibodies. *Infect Immun* (2012) 80:1203–8. doi: 10.1128/IAI.05924-11
30. Chen E, Salinas ND, Huang Y, Ntumngia F, Plasencia MD, Gross ML, et al. Broadly Neutralizing Epitopes in the Plasmodium Vivax Vaccine Candidate Duffy Binding Protein. *Proc Natl Acad Sci* (2016) 113:6277–82. doi: 10.1073/pnas.1600488113
31. Kano FS, Sanchez BAM, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein: Baseline Antibody Responses and Parasite Polymorphisms in a Well-Consolidated Settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Heal* (2012) 17:989–1000. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x
32. Fang X, Kaslow D, Adams J, Miller L. Cloning of the Plasmodium Vivax Duffy Receptor. *Mol Biochem Parasitol* (1991) 44:125–32. doi: 10.1016/0166-6851(91)90228-X
33. Sousa TN, Tarazona-Santos EM, Wilson DJ, Madureira AP, Falcão PR, Fontes CJ, et al. Genetic Variability and Natural Selection at the Ligand Domain of the Duffy Binding Protein in Brazilian Plasmodium Vivax Populations. *Malar J* (2010) 9:334. doi: 10.1186/1475-2875-9-334
34. Ntumngia FB, Adams JH, Chen E, Tolia NH, Salinas ND. Structural Analysis of the Synthetic Duffy Binding Protein (DBP) Antigen DEKnull Relevant for Plasmodium Vivax Malaria Vaccine Design. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) 9:e0003644. doi: 10.1371/journal.pntd.0003644
35. Ntumngia FB, Adams JH. Design and Immunogenicity of a Novel Synthetic Antigen Based on the Ligand Domain of the Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein. *Clin Vaccine Immunol* (2012) 19:30–6. doi: 10.1128/CVI.05466-11
36. Ceravolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJF, Brito CFA, Souza JM, et al. Anti-Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein Antibodies Measure Exposure to Malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* (2005) 72:675–81. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.675
37. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Costa HL, Torres LM, et al. Blood-Stage Plasmodium Vivax Antibody Dynamics in a Low Transmission Setting: A Nine Year Follow-Up Study in the Amazon Region. *PLoS One* (2018) 13:e0207244. doi: 10.1371/journal.pone.0207244
38. Sullivan KM, Dean A, Soe MM. On Academics : OpenEpi: A Web-Based Epidemiologic and Statistical Calculator for Public Health. *Public Health Rep* (2009) 124:471–4. doi: 10.1177/003335490912400320
39. Arévalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S. Current Status of Plasmodium Vivax Vaccine. *Hum Vaccin* (2010) 6:124–32. doi: 10.4161/hv.6.1.9931
40. de Cassan SC, Rushdi Shakri A, Llewellyn D, Elias SC, Cho JS, Goodman AL, et al. Preclinical Assessment of Viral Vectored and Protein Vaccines Targeting the Duffy-Binding Protein Region II of Plasmodium Vivax. *Front Immunol* (2015) 6:348. doi: 10.3389/fimmu.2015.00348
41. Wideman TH, Zautra AJ, Edwards RR. Finding the Sweet Spots of Inhibition: Understanding the Targets of a Functional Antibody Against Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein. *NIH Public Access* (2014) 154:2262–5. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.005.Re-Thinking
42. Chootong P, Panichakul T, Permmongkol C, Barnes SJ, Udomsangpetch R, Adams JH. Characterization of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II Immunity: Approach to Plasmodium Vivax Vaccine Development in Thailand. *PLoS One* (2012) 7:e35769. doi: 10.1371/journal.pone.0035769
43. Chootong P, McHenry AM, Ntumngia FB, Sattabongkot J, Adams JH. The Association of Duffy Binding Protein Region II Polymorphisms and Its Antigenicity in Plasmodium Vivax Isolates From Thailand. *Parasitol Int* (2014) 63:858–64. doi: 10.1016/j.parint.2014.07.014
44. Tsuboi T, Kappe SH, Al-Yaman F, Prickett MD, Alpers M, Adams JH. Natural Variation Within the Principal Adhesion Domain of the Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein. *Infect Immun* (1994) 62:5581–6. doi: 10.1128/iai.62.12.5581-5586.1994
45. Carinelli S, Marti M, Alegret S, Pividori MI. Biomarker Detection of Global Infectious Diseases Based on Magnetic Particles. *N Biotechnol* (2015) 32:521–32. doi: 10.1016/j.nbt.2015.04.002
46. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM, et al. A Multiplexed Fluorescent Microsphere Immunoassay for Antibodies to Pneumococcal Capsular Polysaccharides. *Am J Clin Pathol* (2002) 117:589–96. doi: 10.1309/LMCH-C4Q2-VFL9-3T1A
47. Lal G, Balmer P, Joseph H, Dawson M, Borrow R. Development and Evaluation of a Tetraplex Flow Cytometric Assay for Quantitation of Serum Antibodies to Neisseria Meningitidis Serogroups A, C, Y, and W-135. *Clin Diagn Lab Immunol* (2004) 11:272–9. doi: 10.1128/CDLI.11.2.272-279.2004
48. Longley RJ, White MT, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Li Wai Suen CSN, et al. Naturally Acquired Antibody Responses to More Than 300 Plasmodium Vivax Proteins in Three Geographic Regions. *PLoS Negl Trop Dis* (2017) 11:e0005888. doi: 10.1371/journal.pntd.0005888
49. de Sousa TN, Carvalho LH, de Brito CFA. Worldwide Genetic Variability of the Duffy Binding Protein: Insights Into Plasmodium Vivax Vaccine Development. *PLoS One* (2011) 6:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0022944
50. Fouda GG, Leke RFG, Long C, Druilhe P, Zhou A, Taylor DW, et al. Multiplex Assay for Simultaneous Measurement of Antibodies to Multiple Plasmodium Falciparum Antigens. *Clin Vaccine Immunol* (2006) 13:1307–13. doi: 10.1128/CVI.00183-06
51. Priest JW, Plucinski MM, Huber CS, Rogier E, Mao B, Gregory CJ, et al. Specificity of the IgG Antibody Response to Plasmodium Falciparum, Plasmodium Vivax, Plasmodium Malariae, and Plasmodium Ovale MSP119 Subunit Proteins in Multiplexed Serologic Assays. *Malar J* (2018) 17:417. doi: 10.1186/s12936-018-2566-0
52. Gruszczak J, Kanjee U, Chan L-J, Menant S, Malleret B, Lim NTY, et al. Transferrin Receptor 1 Is a Reticulocyte-Specific Receptor for Plasmodium Vivax. *Sci (80-)* (2018) 359:48–55. doi: 10.1126/science.aan1078
53. Chan L, Dietrich MH, Nguitragool W, Tham W. Plasmodium Vivax Reticulocyte Binding Proteins for Invasion Into Reticulocytes. *Cell Microbiol* (2020) 22:1–11. doi: 10.1111/cmi.13110
54. Malleret B, El Sahili A, Tay MZ, Carissimo G, Ong ASM, Novera W, et al. Plasmodium Vivax Binds Host CD98hc (SLC3A2) to Enter Immature Red Blood Cells. *Nat Microbiol* (2021) 6:991–9. doi: 10.1038/s41564-021-00939-3
55. Ntumngia FB, Thomson-Luque R, Torres L de M, Gunalan K, Carvalho LH, Adams JH. A Novel Erythrocyte Binding Protein of Plasmodium Vivax Suggests an Alternate Invasion Pathway Into Duffy-Positive Reticulocytes. *MBio* (2016) 7:1–5. doi: 10.1128/mBio.01261-16
56. Medeiros CMP, Moreira EUM, Pires CV, Torres LM, Guimarães LFF, Alves JRS, et al. Dynamics of IgM and IgG Responses to the Next Generation of Engineered Duffy Binding Protein II Immunity: Strain-Specific and Strain-Transcending Immune Responses Over a Nine-Year Period. *PLoS One* (2020) 15:e0232786. doi: 10.1371/journal.pone.0232786
57. Rawlinson TA, Barber NM, Mohring F, Cho JS, Kosaisavee V, Gérard SF, et al. Structural Basis for Inhibition of Plasmodium Vivax Invasion by a Broadly Neutralizing Vaccine-Induced Human Antibody. *Nat Microbiol* (2019) 4:1497–507. doi: 10.1038/s41564-019-0462-1

Conflict of Interest: 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.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Alves, de Araújo, Pires, Teixeira-Carvalho, Lima, Torres, Ntumngia, Adams, Kano and Carvalho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.