

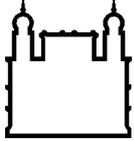
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA AS
PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DO MEROZOÍTO DE LIGAÇÃO AO
DUFFY 1 E 2 (MSPDBL-1 E A MSPDBL-2) DE *Plasmodium*
falciparum EM POPULAÇÕES NATURALMENTE EXPOSTAS A
MALÁRIA DE ÁREAS ENDÊMICAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

MARÍLIA GUEDES LIMA

Rio de Janeiro
Março de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Marília Guedes Lima

Avaliação da resposta imune humoral contra as Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao *Duffy* 1 e 2 (MSPDBL-1 e a MSPDBL-2) de *Plasmodium falciparum* em populações naturalmente expostas a malária de áreas endêmicas da Amazônia Brasileira

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Lilian Rose Pratt-Riccio

RIO DE JANEIRO

Março de 2022

ii

Guedes Lima, Marília.

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA AS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DO MEROZOÍTO DE LIGAÇÃO AO DUFFY 1 E 2 (MSPDBL-1 E A MSPDBL-2) DE *Plasmodium falciparum* EM POPULAÇÕES NATURALMENTE EXPOSTAS A MALÁRIA DE ÁREAS ENDÊMICAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA / Marília Guedes Lima. - Rio de Janeiro, 2022.

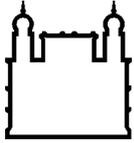
139 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientadora: Lilian Rose Pratt-Riccio.

Bibliografia: f. 83-95

1. MSPDBL-1. 2. MSPDBL-2. 3. Mapeamento de Epítipo. 4. Anticorpos. 5. Malária. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: MARÍLIA GUEDES LIMA

Avaliação da resposta imune humoral contra as Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao *Duffy* 1 e 2 (MSPDBL-1 e a MSPDBL-2) de *Plasmodium falciparum* em populações naturalmente expostas a malária de áreas endêmicas da Amazônia Brasileira

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. LILIAN ROSE PRATT-RICCIO

Aprovada em: 24/03/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira – Revisora e Presidente (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz)

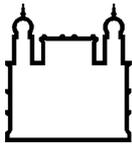
Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado (Universidade Federal Fluminense)

Prof. Dra. Daiana da Souza Perce-da-Silva (Faculdade de Medicina de Petrópolis)

Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva (Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, Fiocruz)

Prof. Dra. Sylvia Lopes Maia Texeira (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz)

Rio de Janeiro, 24 de março de 2022.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Marilia Guedes Lima**, sob orientação da Dr^a. Lilian Rose Pratt Riccio. Ao vigésimo quarto dia do mês de março de dois mil e vinte e dois, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "**Avaliação da resposta imune humoral contra as Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 e a MSPDBL-2) de 'Plasmodium falciparum' em populações naturalmente expostas à malária de áreas endêmicas da Amazônia brasileira**", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia Celular e Ultra-Estrutura de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Joseli de Oliveira Ferreira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado– UFF/RJ, Dr^a. Daiana de Souza Perce da Silva – UNIFASE/RJ, e como suplentes: Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva- BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ e Dr^a. Sylvia Lopes Maia Teixeira - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela **Aprovação** da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 24 de março de 2022.

Dr^a. Joseli de Oliveira Ferreira (Presidente da Banca):

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

A TODOS AQUELES QUE ACREDITAM NOS SEUS SONHOS.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Oswaldo Cruz, que, por meio do Curso de Pós-Graduação em Parasitologia, deram a mim o suporte acadêmico.

À Doutora Lílian Rose Pratt Riccio pela confiança e amizade, pela orientação e por todo o estímulo que recebi para seguir sem medo.

Ao Doutor Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro pela gentileza em me receber no Laboratório de Pesquisas em Malária – IOC/Fiocruz, onde foi possível desenvolver as atividades práticas da minha dissertação.

Aos demais pesquisadores Doutora Fátima Cruz, Doutor Leonardo Carvalho, Doutor Paulo Totino e Doutora Flávia Gomes pelos conselhos, orientações e apoio.

À minha família, meu companheiro de vida Ronald Sartore e minhas filhas Nathalia e Sarah por toda a paciência, carinho, apoio, incentivo, ajuda.

Meu agradecimento em especial a Doutoranda Bárbara Baptista que, por ser essa profissional comprometida com seu trabalho e com o laboratório, tanto me ensinou e me mostrou alguns caminhos que contribuíram muito com o meu trabalho.

Aos doutores da banca: Joseli de Oliveira Ferreira, Ricardo Luiz Dantas Machado, Daiana de Souza Perce da Silva, Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva e Sylvia Lopes Maia Texeira.

Às Doutoradas Monick Lindermeier, Sylvia Lopes Maia Texeira e Fernanda Heloise Cortes, do Laboratório de AIDS e à Doutora Joseli Oliveira Ferreira e ao Doutor Josué Lima do Laboratório de Imunoparasitologia – IOC/Fiocruz, por permitirem a minha presença em seus laboratórios para a utilização de equipamentos.

Aos colaboradores desse projeto: a Doutoranda Bárbara de Oliveira Baptista, o Doutor Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, a Doutora Evelyn Kety Pratt Riccio e o Doutor Paulo Renato Rivas Totino, do Laboratório de Pesquisas em Malária – IOC/Fiocruz; Doutor Josué da Costa Lima Júnior do Laboratório de Imuoparasitologia – IOC/Fiocruz; Doutor Rodrigo Nunes de Biomanguinhos – Fiocruz; Doutora Linda Amoah da Medical Research, Accra, Ghana; Doutores Michael Theisen e Susheel Kumar do Department of Clinical Biochemistry

Immunology and Genéticas, Statens Serum Institut, Copenhage, Dinamarca; e Doutor Rodrigo Medeiros da Universidade Federal do Acre, UFAC.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Malária Aline Lavigne, Aline Moreira, Carol, Cesare, Cláudia, Daiana, Fabiana, Guilherme, Hugo, Jenifer, Juliana, Lilian, Luana, Lucas, Lucas Freire, Micaela, Pamela, Rebeca, Saba, Uyla.

À amiga que fiz no Laboratório, Pâmela, que foi muito generosa e, em muitos momentos, me ajudou, e, que, apesar de muito jovem, sempre muito madura em seus conselhos.

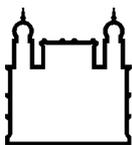
A todos os professores das disciplinas que tive a oportunidade de conhecer e que me ensinaram e me enriqueceram com os seus conhecimentos.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento.

Aos colegas de turma dos cursos de Parasitologia I e II. Foram os momentos mais tensos, mas também os mais felizes, porque aprendi muito, não só com as aulas, mas a convivência com esses jovens colegas.

E a todos aqueles que não foram aqui citados, mas que estiveram presentes em alguma parte desse processo e que contribuíram com a minha formação.

“A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.
Para que serve a utopia?
Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”
Autor: Fernando Birri



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação da resposta imune humoral contra as Proteínas de Superfície de Merozoítos de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 e a MSPDBL-2) de *Plasmodium falciparum* em populações naturalmente expostas a malária de áreas endêmicas da Amazônia

Brasileira

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: BIOLOGIA PARASITÁRIA

Marília Guedes Lima

A malária permanece um fardo tremendo para a saúde pública mundial, causando 627.000 mortes e gerando morbidade em mais de 241 milhões de indivíduos. Em humanos, a doença é causada por sete espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo o *P. falciparum* a espécie responsável pelos casos graves e mortalidade. A infecção por essa espécie é preocupante no Brasil, principalmente após a descrição de isolados com susceptibilidade reduzida a derivados de artemisinina no Suriname e Guiana Francesa, alertando para o risco de surgimento e introdução de resistência a antimaláricos no Brasil. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina tem sido uma das principais estratégias para enfrentar esse problema. As Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 e a MSPDBL-2) são duas proteínas que se ligam diretamente a Proteína da Superfície do Merozoíto 1 (MSP-1) do parasito, formando um complexo na superfície do eritrócito através do seu Domínio de Ligação ao Duffy (DBL) facilitando a invasão do *P. falciparum* no eritrócito. Estudos mostraram que anticorpos contra MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são capazes de inibir o crescimento do *P. falciparum* *in vitro* e estão associados com proteção contra a malária clínica, sugerindo um importante papel na imunidade antimalárica. No presente trabalho, nos propomos a avaliar o perfil da resposta imune humoral contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *P. falciparum* e identificar e validar os epítomos imunodominantes dessas proteínas em indivíduos naturalmente expostos a malária, residentes em áreas endêmicas do Acre e Amazonas. Nosso trabalho foi realizado em Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima, no Estado do Acre, Guajará, no Estado do Amazonas, Amazônia Brasileira. A pesquisa de anticorpos específicos para as proteínas foi realizada pela técnica de ELISA utilizando proteínas recombinantes correspondentes a região DBL de MSPDBL-1 e MSPDBL-2. Os epítomos lineares de células B foram identificados utilizando o software BcPreds e validados por ELISA, utilizando peptídeos sintéticos correspondentes aos epítomos identificados. Nossos dados mostraram que as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são amplamente reconhecidas por anticorpos naturalmente adquiridos em indivíduos residentes nas áreas estudadas e que esses anticorpos são principalmente citofílicos (IgG1 e IgG3), fato importante considerando que a aquisição de uma imunidade protetora está associada aos níveis de IgG1 e IgG3. A análise de predição identificou 3 epítomos de células B na região DBL da MSPDBL-1 (P1, P2 e P3) e 6 epítomos na região DBL da MSPDBL-2 (P4, P5, P6, P7, P8 e P9). A grande maioria dos indivíduos apresentou anticorpos que reconheciam pelo menos um dos epítomos identificados na predição. Os epítomos imunodominantes foram P3 da MSPDBL-1 e P4 e P5 da MSPDBL-2. Em conjunto, nossos dados indicam que MSPDBL-1 e MSPDBL-2 podem ser alvos de uma imunidade naturalmente adquirida.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of the humoral immune response against Merozoite Surface Protein Duffy-Binding-Like 1 and 2 (MSPDBL-1 and MSPDBL-2) of *Plasmodium falciparum* in populations naturally exposed to malaria from endemic areas of the Brazilian Amazon

ABSTRACT

MASTER'S THESIS: PARASITE BIOLOGY

Marília Guedes Lima

Malaria remains a tremendous burden on public health worldwide, causing 627,000 deaths and generating morbidity in more than 241 million individuals. In humans, the disease is caused by seven species of protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, *P. falciparum* being the species responsible for the severe cases and mortality. The infection by this species is of concern in Brazil, especially after isolates with reduced susceptibility to artemisinin derivatives were described in Suriname and French Guiana, alerting to the risk of emergence and introduction of antimalarial drug resistance in Brazil. In this context, the development of a vaccine has been one of the main strategies to face this problem. Merozoite Surface Protein Duffy Binding-like -1 and -2 (MSPDBL-1 and MSPDBL-2) are two proteins that bind directly to MSP-1 on the surface of the parasite, forming a complex on the erythrocyte surface through its DBL domain facilitating the invasion of *P. falciparum* into the erythrocyte. Studies have shown that antibodies against Mspdbl-1 and Mspdbl-2 are able to inhibit *P. falciparum* growth *in vitro* and are associated with protection against clinical malaria, suggesting an important role in antimalarial immunity. In the present study, we propose to evaluate the humoral immune response profile against *P. falciparum* MSPDBL-1 and MSPDBL-2 proteins and to identify and validate the immunodominant epitopes of these proteins in individuals naturally exposed to malaria, residing in endemic areas of Acre and Amazonas. Our work was carried out in Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima, in the State of Acre, and Guajará, in the State of Amazonas, Brazilian Amazon. The search for protein-specific antibodies was performed by ELISA using recombinant proteins corresponding to the DBL region of MSPDBL-1 and MSPDBL-2. Linear B-cell epitopes were identified using BcPreds software and validated by ELISA using synthetic peptides corresponding to the identified epitopes. Our data showed that MSPDBL-1 and MSPDBL-2 proteins are widely recognized by naturally acquired antibodies in individuals residing in the studied areas and that these antibodies are mainly cytophilic (IgG1 and IgG3), an important fact considering that the acquisition of a protective immunity is associated with IgG1 and IgG3 levels. Prediction analysis identified 3 B-cell epitopes in the DBL region of MSPDBL-1 (P1, P2 and P3) and 6 epitopes in the DBL region of MSPDBL-2 (P4, P5, P6, P7, P8 and P9). Most individuals had antibodies that recognized at least one of the epitopes identified in the prediction. The immunodominant epitopes were P3 of MSPDBL-1 and P4 and P5 of MSPDBL-2. Taken together, our data indicate that MSPDBL-1 and MSPDBL-2 may be targets of naturally acquired immunity.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A Malária	1
1.2 A malária no Brasil: passado, presente e futuro	5
1.3 Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i>	10
1.4 O papel dos anticorpos na imunidade antimalárica.....	13
1.5 A busca por uma vacina contra o <i>P. falciparum</i>	18
1.6 A superfície de merozoíto e as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	28
1.7 Justificativa	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Descrição das áreas estudadas	34
3.2 Voluntários.....	35
3.3 Coleta de dados pessoais e epidemiológicos	36
3.4 Coleta de sangue.....	37
3.5 Diagnóstico de malária	37
3.6 Proteínas recombinantes de MSPDBL-1 e MSPDBL-2	39
3.7 Predição de epítomos lineares/contínuos de célula B.....	40
3.8 Síntese dos peptídeos	40
3.9 Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 e peptídeos	41
3.10 Análise dos dados epidemiológicos e estatístico	42
4 RESULTADOS	45
4.1 Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos do estudo	45
4.2 Avaliação da resposta imune contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	51

4.3	Avaliação da resposta anticorpo contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em função dos dados pessoais e epidemiológicos	60
4.4	Predição de epítomos B lineares de MSPDBL-1 e MSPDBL-2.....	63
4.5	Mapeamento de epítomos	66
5	DISCUSSÃO	74
6	PERSPECTIVAS	81
7	CONCLUSÕES	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9	ANEXOS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da malária no mundo.....	4
Figura 2 – Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2019	7
Figura 3 – Mapa de risco de distribuição da malária no Brasil, Brasil 2019.	9
Figura 4 – Municípios prioritários para malária falciparum e malária mista em 2019 e estratificação de acordo com o percentual do total de casos autóctones	9
Figura 5 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	11
Figura 6 Representação esquemática de mecanismos por anticorpos na imunidade contra as formas eritrocíticas do <i>P. falciparum</i>	16
Figura 7 – MSPDBL-1 e MSPDBL-2 formam um complexo com MSP-1 que medeia a interação com o eritrócito durante a invasão	30
Figura 8 – Representação esquemática das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	30
Figura 9 – Destaque das áreas de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará	35
Figura 10 – Sequência de aminoácidos da proteína recombinante MSPDBL-1.	39
Figura 11 – Sequência de aminoácidos da proteína recombinante MSPDBL-2.	39
Figura 12 – Resumo esquemático da metodologia	44
Figura 13 – Procedência dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima), GJ (Guajará) e CO (Grupo Controle)	49
Figura 14 – Frequência de espécies plasmodiais de episódios prévios de malária (A) e última espécie plasmodial infectante (B).....	50
Figura 15 – Prevalências da resposta anticorpo das classes IgG e IgM contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	52
Figura 16 – Índices de reatividade dos anticorpos IgG e IgM para as proteínas recombinantes MSPDBL-1 e a MSPDBL-2 nos indivíduos estudados	54
Figura 17 – Correlação entre IgG ou IgM contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	55
Figura 18 – Prevalência de indivíduos com IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	57

Figura 19 – Índices de reatividade de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos para as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	59
Figura 20 – Índices de reatividade de anticorpos contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em indivíduos não infectados, infectados por <i>P. vivax</i> ou <i>P. falciparum</i>	62
Figura 21 – Estrutura de modelagem e análise <i>in silico</i> de epítomos das MSPDBL-1 e MSPDBL-2	64
Figura 22 – Epítomos preditos (em vermelho), com a utilização do software BCPreds, dentro da região DBL (em azul) nas proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	65
Figura 23 – Número de epítomos das proteínas MSPDBL-1 (A) e MSPDBL-2 (B) reconhecidos pelos anticorpos dos indivíduos estudados	67
Figura 24 – Prevalências de indivíduos com anticorpos contra os epítomos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	69
Figura 25 – Frequência de ocorrência de indivíduos com anticorpos IgG para os epítomos P1, P2, P3 da MSPDBL-1	70
Figura 26 – Frequência de ocorrência de indivíduos com anticorpos IgG para os epítomos P3, P4, P5, P6, P7, P8 e P9 da MSPDBL-2	71
Figura 27 – Índice de reatividade de anticorpos IgG contra os epítomos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.....	72
Figura 28 – Índices de reatividade dos anticorpos IgG contra os epítomos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDL-2 em indivíduos não infectados, infectados por <i>P. vivax</i> ou infectados por <i>P. falciparum</i>	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais antígenos plasmodiais candidatos à vacina antimalárica	27
Tabela 2 – Peptídeos sintetizados correspondentes aos epítomos B preditos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	41
Tabela 3 – Principais características dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima) e GJ (Guajará)	48
Tabela 4 – Características pessoais, clínicas e epidemiológicas apresentadas pelos respondedores e não respondedores para as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	61
Tabela 5 – Epítomos de célula B identificados na região DBL das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente De Anticorpo
ADCI	Inibição Celular Dependente De Anticorpo
ADRB	Explosão Respiratória Dependente De Anticorpos
AMA	Antígeno de Membrana Apical
CelTos	Célula Transversal para Oocinetos e Esporozoítos
CO	Grupo Controle
CSP	Circumesporozoíto
CZS	Cruzeiro do Sul
DBL	Duffy Binding-Like
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
EBA	Erythrocyte Binding Antigen
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ou ácido etilenodiamino tetraacético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GJ	Guajará
GPA	Glicoforina A
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFN-gama	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Igs	Imunoglobulinas
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
IPA	Incidência Parasitária Anual
LLZ	Leucine Zipper-Like
LSA	Antígenos do Estágio Hepático
LVC	Lâmina de Verificação de Cura
ML	Mâncio Lima
MS	Ministério da Saúde
MSP	Proteína de Superfície de Merozoíto
MVA	Vírus da vacina modificada
NANP	Sequência repetitiva da Proteína CS de <i>Plasmodium falciparum</i> Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina

NK	Natural Killer
NPH	Primatas Não Humanos
ODM	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
ODS	Objetivo de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	Ortofenilelenodiamino
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
RESA	Antígeno de Superfície de Eritrócito infectado com Anel
SEA-1	Schizont Egress Antigen-1
SERA	Antígeno Rico em Serina
SHM	Sistema de Informação Série Histórica de Malária
SINAM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISMAL	Sistema de Informação do Programa Nacional de Controle da Malária
SPAM	Antígeno Polimórfico Secretado Associado com Merozoítos
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismo de Nucleotídeos Simples)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
UFAC	Universidade Federal do Acre

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Malária

A malária, também é conhecida por paludismo, impaludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã benigna, febre terçã maligna, febre quartã, maleita, sezão, tremedeira, batedeira ou, simplesmente, febre. É uma doença infecciosa febril aguda e de alta prevalência, cujo agente etiológico é o protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, da família Plasmodiidae e do gênero *Plasmodium* (1-3). Mais de 250 espécies de *Plasmodium* foram formalmente descritas, e cada espécie infecta diferentes hospedeiros, como aves, lagartos, cobras e mamíferos. Entretanto, apenas sete infectam naturalmente o homem: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium knowlesi* (Knowles & Das Gupta, 1932), *Plasmodium simium* (Fonseca, 1951) e *Plasmodium cynomolgi* (Mayer, 1907) (4-7). Estas três últimas são espécies de *Plasmodium* que infectam primatas não humanos (NHP) e, também, podem infectar os seres humanos, como anteriormente relatado na Ásia e nas Américas (8-14).

A malária é transmitida pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (1-3). A fêmea busca o sangue como refeição para nutrir seus ovos e depositá-los na água e o tipo de coleção de água adequado para o desenvolvimento das larvas é bastante variável entre espécies de mosquitos, e mesmo dentro da mesma espécie. Algumas espécies preferem pequenos acúmulos de água doce ou salobra, outras poças ou bolsões de água formados nas curvas de rios. Os habitats larvários vão influenciar diretamente o seu desenvolvimento por meio das condições climáticas, tais como, precipitação, temperatura e umidade (4,15,16,17). Esses mosquitos são mais abundantes durante a estação chuvosa nos países tropicais, com pico de transmissão durante e depois da estação de chuva. Existem mais de 400 espécies diferentes de anofelinos, porém, apenas aproximadamente, 30 são considerados os vetores mais importantes na transmissão da malária. Algumas espécies de vetores de maior importância têm hábito crepuscular (picam ao anoitecer e ao amanhecer), porém o *Anopheles darlingi*, que é a espécie de vetor mais importante no Brasil, pica à noite

inteira até o amanhecer (17). A intensidade da transmissão depende de fatores relacionados ao parasito, vetor, hospedeiro humano e ambiente.

A origem do *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, os principais causadores da malária em humanos, tem sido objeto de muito debate. Até recentemente, acreditava-se amplamente que o *P. falciparum* havia coevoluído com os humanos e nossos ancestrais ao longo de milhões de anos, enquanto se supunha que o *P. vivax* tivesse surgido no sudeste da Ásia após a transmissão entre espécies de um parasita de macaco. No entanto, a descoberta de uma infinidade de *Plasmodium spp.* em chimpanzés e gorilas refutou essas teorias e, em vez disso, revelou que tanto o *P. falciparum* quanto o *P. vivax* evoluíram de parasitas que infectam macacos africanos selvagens (18). Embora muitas questões permaneçam sobre a biologia e o potencial zoonótico dos parasitas semelhantes a *P. falciparum* e *P. vivax* que infectam macacos, a genômica comparativa, juntamente com estudos funcionais de parasitas e vetores, provavelmente fornecerão novas revelações sobre a transmissão e patogênese do *Plasmodium* de macacos (18,19).

A chegada da doença ao Novo Mundo ainda hoje é motivo de especulações (19,20). É possível que tenha sido pelas viagens transpácificas em tempos remotos ou de colonizadores espanhóis e portugueses a partir do século XVI (20).

Referências a febres sazonais e intermitentes são relatados em textos religiosos e médicos antigos relacionando a doença à punição de deuses e à presença de maus espíritos. O *Nei Ching*, de 4700 anos, refere-se aos “paroxismos febris associados à esplenomegalia e tendência a ocorrência epidêmica” (21). Escrituras hindus de templos Vedas do Norte da Índia, de 3500 anos, contêm muitas referências sobre “febres, com calafrios, tremores e delírios, que retornam em sucessivos dias” (21). Entre 3500 e 4000 anos, sumerianos e egípcios fizeram relatos sobre “febres intermitentes com esplenomegalia” (22).

No século V a.C., Hipócrates descreveu a doença com características de ocorrência sazonal e de febre com padrão paroxístico e intermitente, sendo o pioneiro na descrição detalhada dos sintomas e das complicações causadas pela enfermidade (23). Depois de Hipócrates, em meados do século II d.C., diversos médicos gregos e romanos fizeram referências sobre a doença, que ocorria em epidemias cíclicas na

Grécia, Itália e outras partes da Europa, onde era conhecida como "Febre Romana". No século XVIII, o termo malária teve sua origem, quando escritores italianos a descreveram como uma doença causada por vapores nocivos exalados dos pântanos, designado de "*mal aire*" com o sentido de mau ar. Apenas no século XIX é que o conhecimento sobre a malária passou por um período de importantes descobertas. Em 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran, observou no sangue fresco de um paciente, organismos em movimento, que posteriormente foi confirmada como hemoparasitose por Gerhardt, em 1884 (1-3). Já naquela época, hipóteses de que a transmissão da malária se dava por inseto foi reforçada por descobertas feitas do papel do *Culex* spp. na transmissão da filariose. Até que, no ano de 1898, o médico inglês Ronald Ross desvendou o ciclo do parasita da malária aviária *Proteosoma relictum* (*Plasmodium relictum*) no *Culex* spp. que permitiu, no ano seguinte, os italianos Grassi, Bignami e Bastinelle completar o ciclo da malária humana no mosquito do gênero *Anopheles* (Meigen, 1818) e alguns anos depois, descrever o ciclo completo do plasmódio em mosquitos (16).

Apesar dos intensos programas de controle utilizados na tentativa de combatê-la, a malária, permanece como uma doença de importância global e um sério problema de saúde pública, causando altos índices de morbidade e mortalidade nas regiões endêmicas (4,24). Atualmente, atinge 85 países e territórios, concentrando-se nas principais áreas tropicais e subtropicais (Figura 1), sendo estimados, em 2020, 241 milhões de casos de malária. Vinte e nove países foram responsáveis por 96% dos casos de malária no mundo, e seis países – Nigéria (27%), República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%), Moçambique (4%), Angola (3,4%) e Burkina Faso (3,4%) - foram responsáveis por cerca de 55% de todos os casos em todo o mundo. Em 2020, as mortes por malária aumentaram 12% em comparação com 2019, passando de estimadas 558 mil em 2019 para 627 mil em 2020, a maioria em crianças abaixo de 5 anos de idade (25).

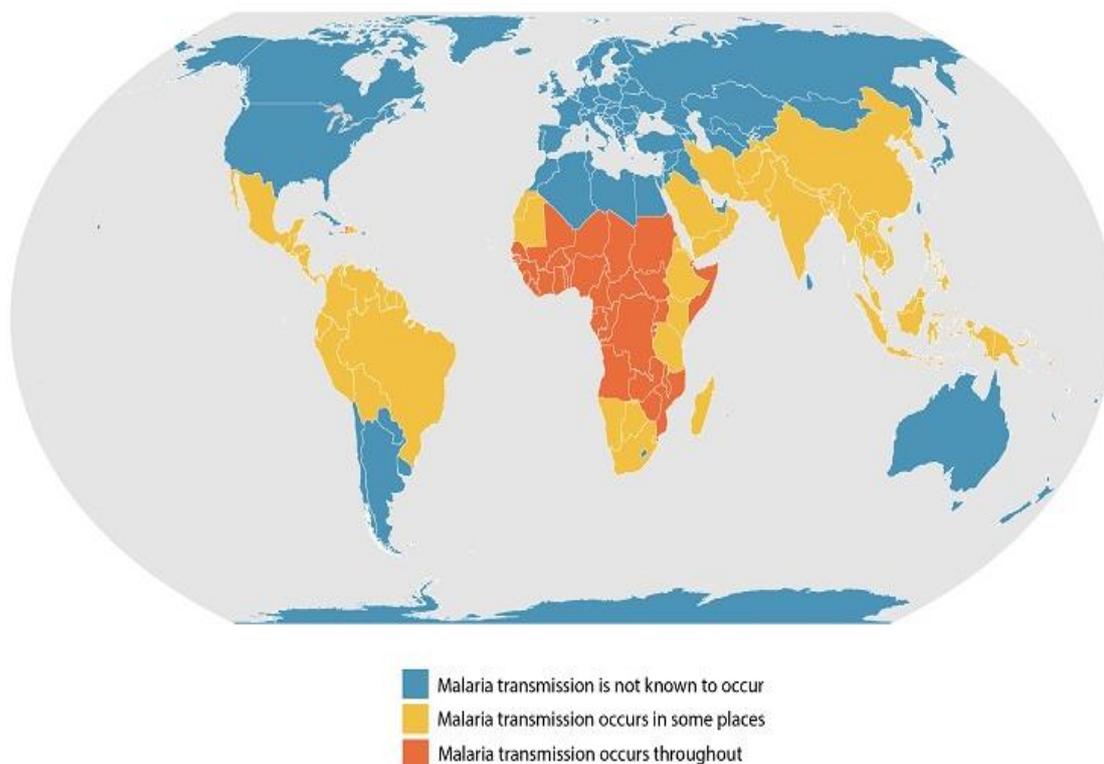


Figure 1. Distribuição da malária no mundo, CDC (26) (2021). Em azul: Transmissão da malária não é conhecida para ocorrer; em laranja: transmissão da malária ocorre em alguns lugares; em vermelho: transmissão da malária ocorre em toda a parte.

O continente Africano é o que mais padece com a ocorrência da malária. Aproximadamente 94% dos casos e mortes no mundo, seguido do Sudeste Asiático (3%) e da região do Mediterrâneo Oriental. As Américas vêm contribuindo com aumento mundial dos números de casos de malária. Estratégias de controle da doença como a utilização de mosquiteiros impregnados com inseticidas, pulverização das paredes internas das residências, diagnóstico rápido e tratamento oportuno têm obtido sucesso em mitigar o número de casos e mortes nas Américas, entretanto o progresso nessa região tem sido afetado pelo aumento do número de casos na Venezuela em 2019. Nas Américas, cerca de 138 milhões de pessoas em 19 países e territórios estão em risco para malária. Brasil, Colômbia e Venezuela respondem por 80% de todos os casos estimados. Em 2019, foram registrados 0,9 milhões de casos e 551 óbitos, sendo o Brasil, a Venezuela e a Colômbia responsáveis por 86% dos casos registrados (15,27).

1.2 A malária no Brasil: passado, presente e futuro

No Brasil, a primeira referência à malária data de 1587, com ocorrência de casos nas tribos Tupinambás, trazida, provavelmente, durante o início da colonização, no século XVI, com o comércio transatlântico de escravos da África (28-30).

Após o período colonial, os maiores impulsionadores da intervenção no controle da malária foram a indústria da borracha e a construção de ferrovias (28,31). A borracha natural foi crucial para a economia do Brasil a partir de meados do século XIX (32). Na década de 1870, os migrantes fugiam das secas nordestinas em busca de trabalho na indústria da borracha amazônica. Como hospedeiros imunologicamente virgens, eram susceptíveis à malária (28,29). Simultaneamente, foram feitos esforços para interligar as vastas terras inexploradas do interior brasileiro por meio de trens e fios de telégrafo.

A partir de 1870, com o início da exploração da borracha e a construção de ferrovias na região Amazônica, a malária tornou-se um grande problema de saúde pública. A exploração da borracha atraiu milhares de imigrantes provenientes do Nordeste, que foram sistematicamente dizimados pela malária (28,29). No Sudeste do país, na mesma época, a transmissão crescia acentuadamente na Baixada Fluminense e no Vale do Paraíba, uma vez que a abolição da escravatura, em 1888, e o colapso da aristocracia rural cafeeira fizeram cessar os pequenos trabalhos de combate à malária. A interrupção dos sistemas de irrigação e drenagem em plantações abandonadas fez com que a Baixada Fluminense, planícies costeiras do RJ e partes do estado de São Paulo (SP) fossem áreas altamente malarígenas por décadas (28).

Comissões para o combate à malária foram criadas em 1891, mas tiveram um desempenho ruim devido a limitação de recursos, atividade esporádica, ignorância e administração dispersa (30). Em particular, Manaus, no estado do Amazonas (AM), passou por quatro comissões sanitárias para o controle de doenças tropicais entre 1897-1913 (32). De 1890-1900, aproximadamente 500.000 brasileiros migraram para a Amazônia em uma "enchente caótica", com muitos se tornando seringueiros (32). De 1892 a 1906, 26,6 pessoas por 10.000 morreram de malária no Nordeste do Brasil, com aproximadamente metade originária de fora da região (33). Assim, no fim

do século XIX e início do século XX, a malária ocorria praticamente em todo o território nacional, com exceção de algumas áreas no Sul do país. A cada ano, havia seis milhões de casos, que representavam 50% da população do Brasil (29).

Nessa época, duas grandes epidemias de malária ocorreram na Amazônia como consequência da migração de nordestinos fugindo da seca do Nordeste para os seringais amazônicos e durante a construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, onde vários trabalhadores caribenhos, brasileiros e bolivianos foram dizimados pela malária (34,35). Outra grande epidemia de malária ocorreu no fim da década de 1930 e início da década de 1940 quando navios franceses que faziam a rota postal França-Natal via Dakar trouxeram o *Anopheles gambiae* que invadiu o Nordeste brasileiro. Um forte esquema de controle da malária foi montado em todo o Nordeste e a epidemia que atingia entre 80 e 90% da população nas áreas invadidas pelo mosquito foi debelada e o *A. Gambiae* foi erradicado do Nordeste (28,36,37).

Na década de 40, para uma população de aproximadamente 55 milhões de habitantes, estimava-se que ocorriam entre 4 e 8 milhões de casos de malária por ano no Brasil, resultando em cerca de 80 mil óbitos (38). Nos anos 50, a grande incidência de malária levou a OMS a adotar um vasto programa de erradicação nas regiões atingidas por essa doença que reduziu sensivelmente o número de casos no país e a doença ficou restrita, quase que exclusivamente, à região Amazônica. Antes desse programa, a transmissão da malária ocorria em quase todo território brasileiro.

Na década de 70, através do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), o governo favoreceu o surgimento de novos polos agrícolas e o desenvolvimento intensificado da Amazônia nessa época acelerou o processo migratório, atraindo moradores de outras regiões do país. Como consequência, nas décadas de 70 e 80, a região Amazônica recebeu, aproximadamente, um milhão de migrantes, na maioria indivíduos não imunes, provenientes de diferentes regiões brasileiras (37). As intensas migrações internas devido aos projetos de colonização e expansão da fronteira agrícola, a construção de rodovias e hidroelétricas e as atividades de madeireira, garimpo e mineração, além da resistência do *P. falciparum* aos quimioterápicos e das precárias condições socioeconômicas da população migrante, determinaram a rápida expansão da doença. Como consequência em 1999 foram registrados 637.474 (38). Essa situação levou o Ministério da Saúde a elaborar o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), desencadeando

uma série de ações na Região Amazônica que colaboraram na inversão da tendência de crescimento da malária. Com o PIACM, que vigorou no período de 2000 a 2002, houve uma redução de 50% na incidência da malária na Região da Amazônica e os casos de malária passaram para menos de 349 mil em 2002. Entretanto, após esta importante redução na transmissão, o número de casos de malária voltou a aumentar a partir de 2003, atingindo novamente a marca de 600 mil casos em 2005 (Figura 2).

A partir de 2006, o número de casos de malária no Brasil começou a decair como resultado de ações integradas de controle, realizadas no âmbito federal, estadual e municipal. Tal decréscimo está relacionado a diversos fatores, dentre os quais se destacam: vigilância epidemiológica, implementação de diagnóstico e tratamento rápido, os quais também foram responsáveis pela diminuição acentuada no número de infecções causadas por *P. falciparum* (39,40,41) (Figura 2).

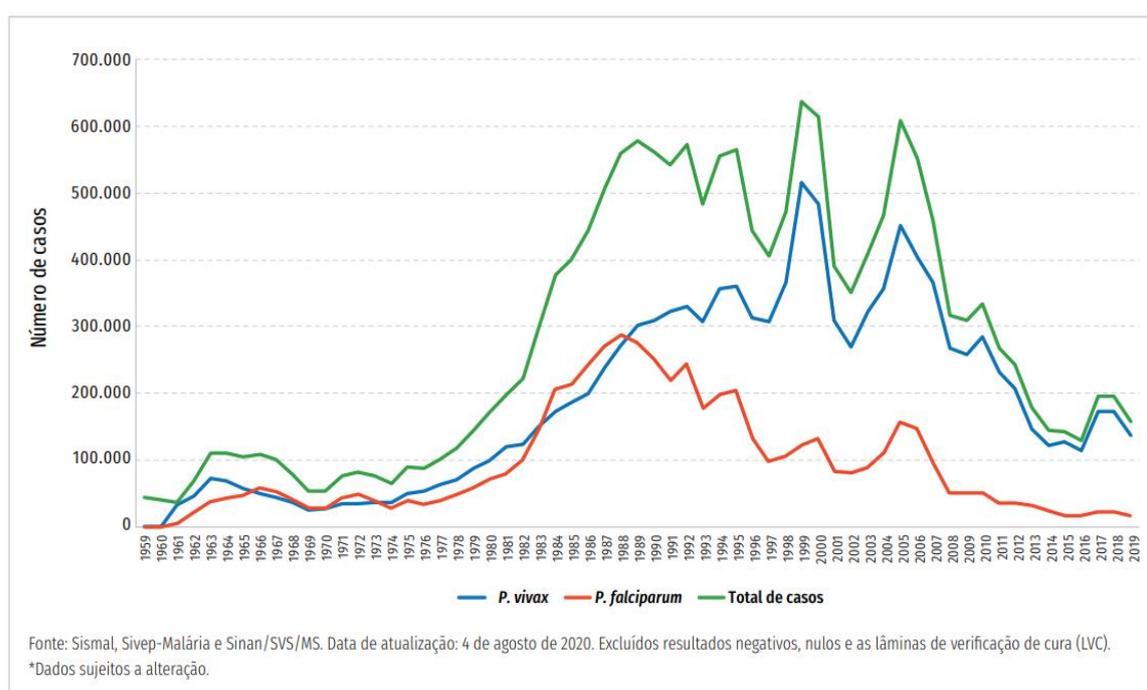


Figura 2. Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2019. (41)

Segundo a OMS, a experiência com as campanhas de erradicação dos anos 1950 e 1960, aliada ao conhecimento e à experiência atuais e investimento em pesquisa, é possível controlar a malária no mundo e eliminá-la em países e regiões onde a transmissão é baixa ou moderada e o sistema de saúde é forte. Seguindo as discussões mundiais, o Brasil lançou, em 2015, o primeiro plano de eliminação de

malária no Brasil que tinha a proposta de eliminação do *P. falciparum* e que, posteriormente, foi ampliada para todas as espécies. O plano nacional de eliminação, que está em elaboração, tem como objetivo estabelecer diretrizes técnicas para que a malária deixe de ser um problema de saúde pública no Brasil, por meio do alcance das metas de (a) menos de 14 mil casos registrados em 2030, o que representa redução de 93% em relação a 2018; (b) eliminar a transmissão de malária por *P. falciparum* até o ano de 2030; (c) eliminar a transmissão de malária até o ano de 2035 e; (d) reduzir o número de óbitos para zero até o ano de 2030.

Atualmente, 99,9% dos casos de malária são registrados na região da Amazônia Legal, composta por nove estados (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão) e 808 municípios. No ano de 2019, o Brasil registrou 157.454 casos de malária (27). Mesmo em área endêmica, a distribuição da malária não é uniforme (Figura 3). Os graus de risco para adoecer de malária são classificados de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA). Esse indicador expressa o número de exames positivos por 1000 habitantes em determinado lugar e período. O IPA < 1 caso: muito baixo risco; IPA entre 1 e 10 casos: baixo risco; IPA entre 10 e 50 casos: médio risco; e IPA ≥ 50 casos: alto risco. Cerca de 80% da malária concentrou-se em 41 municípios no ano de 2019, sendo 16 no Amazonas (39,0%), 8 no Pará (19,5%), 7 em Roraima (17,1%), 4 no Amapá (9,8%), 3 no Acre (7,3%), 2 em Rondônia (4,9%) (27). Em se tratando de malária falciparum e malária mista, a transmissão é ainda mais concentrada, visto que 16 municípios foram considerados prioritários (aqueles que juntos são responsáveis por 80% dos casos autóctones de malária do País) em 2019 (41) (Figura 4).

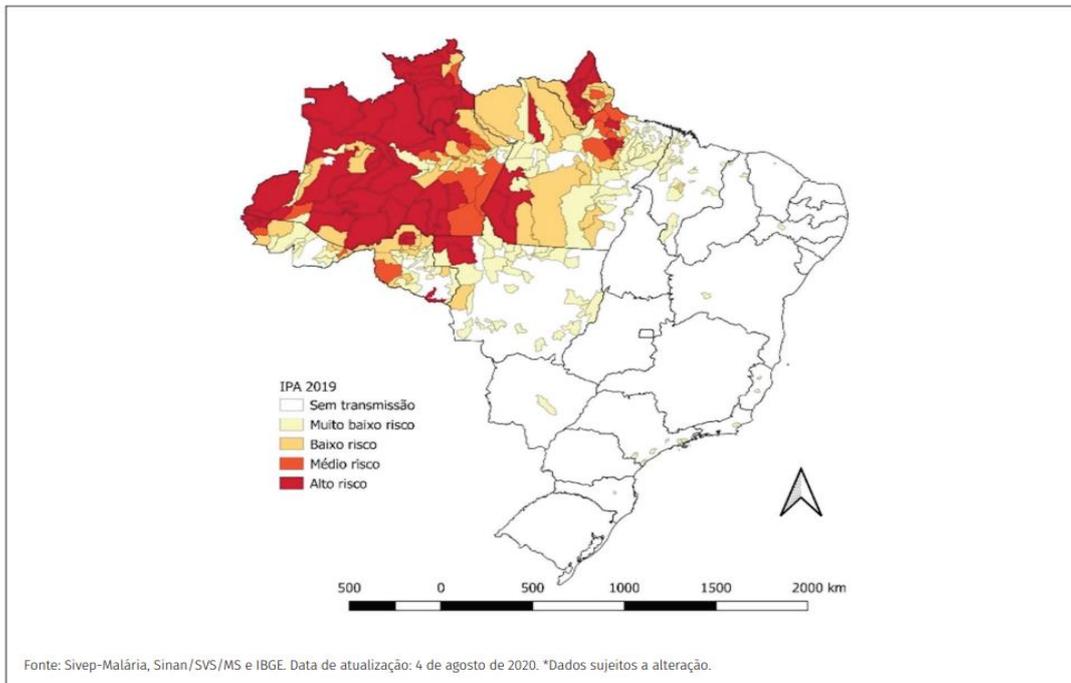


Figure 3. Mapa de risco de distribuição da malária no Brasil, Brasil 2019. (41)

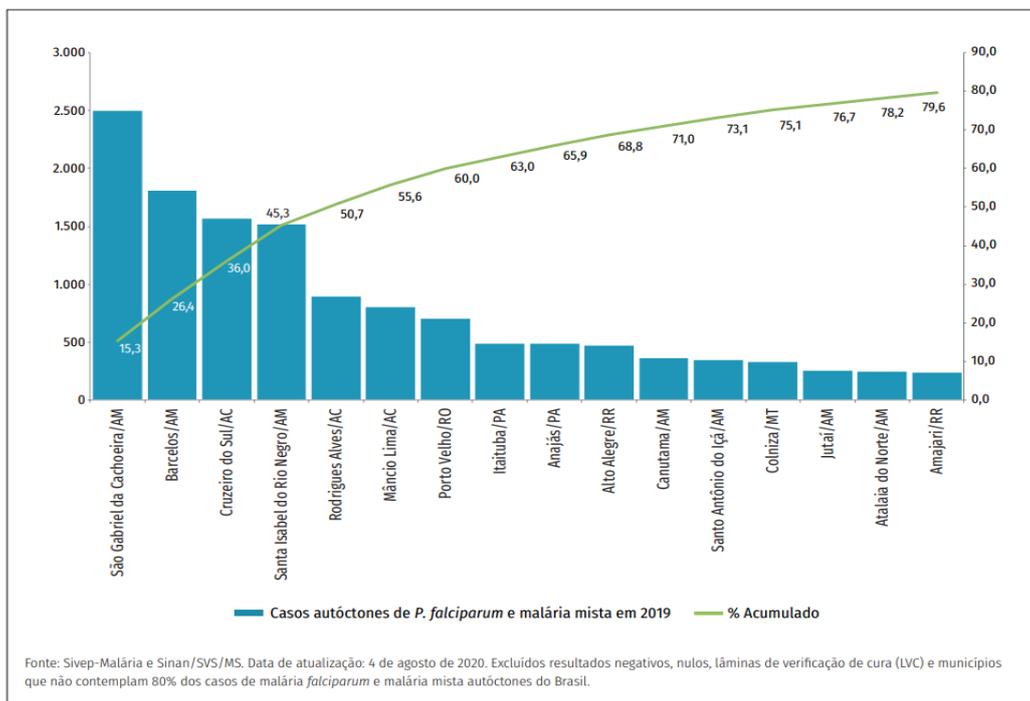


Figure 4. Municípios prioritários para malária falciparum e malária mista em 2019 e estratificação de acordo com o percentual do total de casos autóctones. (41)

Composta por outros 17 estados e o Distrito Federal, a região extra-amazônica é responsável por apenas 0,1% do total de casos notificados no Brasil que ocorrem,

geralmente, em área de Mata Atlântica. A mortalidade devido a malária na região extra-amazônica chega a ser cerca de 80 vezes maior do que na região amazônica, principalmente, por causa do retardo no diagnóstico e no tratamento (27,38). A maioria dos casos notificados na região extra-amazônica são importados de outros estados endêmicos ou outros países, tanto das Américas quanto da África e Ásia. Entretanto, casos autóctones vêm sendo registrados. Os estados que mais notificaram casos autóctones, representando um terço (1/3) do total dos casos de malária, foram o Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Paraná, o que pode demonstrar que a doença pode voltar a ser endêmica nessa área. Desse modo, torna-se fundamental que as atividades de vigilância epidemiológica sejam desenvolvidas de forma contínua nessa área, mostrando, contudo, que a doença não pode ser negligenciada (4,27,38).

Em 2019, foram notificados 153.270 casos autóctones de malária no Brasil, 89,3% foram devido a infecção pelo *P. vivax* e 10,7% devido a infecção pelo *P. falciparum* e malária mista (*P. falciparum* e *P. vivax*). De janeiro a junho de 2020, os casos autóctones foram registrados com queda, tanto a região amazônica quanto a região extra-amazônica brasileira com redução no número total de casos autóctones, sendo respectivamente, de 15% e 71,0% (27).

Considerando-se o número de casos de malária no Brasil e no mundo e a resistência dos plasmódios aos antimaláricos e dos anofelinos aos inseticidas (25,29,39,40), controlar a transmissão da doença continua sendo um grande desafio. Sendo assim, nos últimos anos, esforços têm sido concentrados no desenvolvimento de uma vacina, principalmente contra o *P. falciparum*, espécie responsável pelos casos letais. Entretanto, uma das dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica reside na complexidade do parasito, seu ciclo evolutivo.

1.3 Ciclo Biológico do *Plasmodium*

O *Plasmodium* apresenta um ciclo de vida complexo que envolve dois hospedeiros: um hospedeiro vertebrado intermediário, onde ocorre a reprodução assexuada e um hospedeiro invertebrado definitivo, onde ocorre a reprodução sexuada (1-3) (Figura 5).

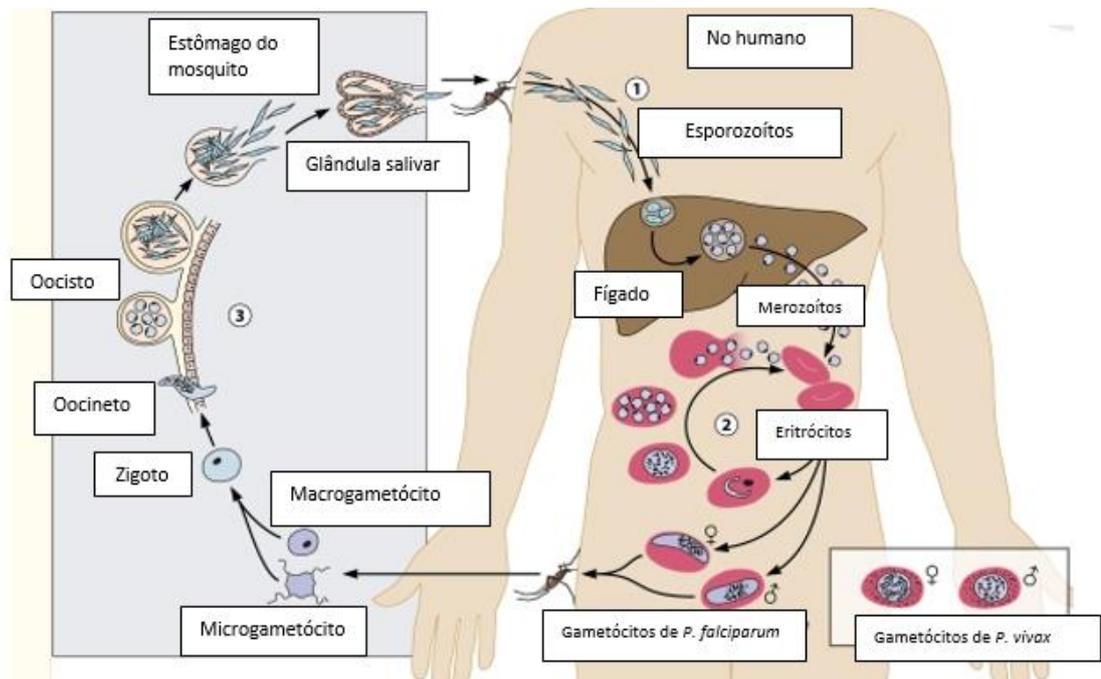


Figure 5. Ciclo de vida do *Plasmodium*, Bousema (42) (2011). No homem: (1) ciclo pré-eritrocítico ou hepático. (2) ciclo eritrocítico. No mosquito: (3) ciclo sexual ou eporogônico.

Ao homem, a malária é transmitida quando fêmeas do mosquito *Anopheles sp.* infectadas com *Plasmodium* inoculam, durante o repasto sanguíneo, os esporozoítos localizados nas glândulas salivares (42,43,44). Uma vez injetados na derme, os esporozoítos podem permanecer viáveis na pele do hospedeiro por várias horas até ativamente migrarem para vasos sanguíneos e vasos linfáticos (35). Apenas os parasitos que atingem a corrente sanguínea são capazes de dar continuidade ao ciclo biológico (42-46). Nos sinusoides hepáticos, os esporozoítos penetram através das células Kupffer no Espaço de Disse e invadem os hepatócitos para iniciar o ciclo exo-eritrocítico ou hepático. Ao chegarem ao fígado, as moléculas de adesão do parasito interagem com moléculas sulfatadas na superfície do hepatócito, permitindo a sua entrada na célula e resultando na formação de um vacúolo parasitóforo que circunda o esporozoíto, formado pela invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira (47-50). Nesse momento, há a formação do vacúolo parasitóforo iniciando um processo de maturação e reprodução assexuada, dando origem a esquizontes hepáticos repletos de merozoítos não-nucleados rodeados por uma membrana parasitófora (47-50). As células hepáticas contendo esquizontes hepáticos maduros se rompem liberando milhares de merozoítos dentro de vesículas chamadas de

merossomos na corrente sanguínea (50,51). Esse evento marca o fim da fase pré-eritrocítica ou hepática do ciclo do *Plasmodium*, que é assintomática. No ciclo pré-eritrocítico de *P. vivax* e *P. ovale*, alguns merozoítos não seguem para a corrente sanguínea e se desenvolvem em formas latentes denominadas hipnozoítos, responsáveis pelas recidivas da malária (51-53).

Após a liberação na corrente sanguínea, os merossomos se rompem, liberando os merozoítos que invadem as hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico, responsável pelas manifestações clínicas da doença. A penetração do merozoíto no eritrócito é dependente de uma série de interações ligante-específicas e ocorre em diversas etapas. Após o reconhecimento, ocorre a reorientação apical do merozoíto em direção a membrana do eritrócito, seguida da formação da junção da membrana das duas células. Posteriormente, ocorre a invaginação da membrana do eritrócito, formando um vacúolo parasitóforo dentro do eritrócito, onde os merozoítos iniciam o ciclo intraeritrocítico, se diferenciando em trofozoíto jovem, trofozoíto maduro e esquizontes sanguíneos. Quando completamente maduro, o eritrócito infectado rompe, liberando os merozoítos que, então, invadem novos eritrócitos, reiniciando todo o ciclo intraeritrocítico, ruptura e reinvasão. O ciclo eritrocítico se repete periodicamente de 48 a 72 horas, dependendo da espécie plasmodial infectante (54,55).

Em cada ciclo de replicação, uma pequena porção de merozoítos, se diferenciam em formas eritrocíticas sexuadas chamados de macrogametócitos (femininos) e microgametócitos (masculinos) que, ao serem ingeridas pelo mosquito susceptível durante o repasto sanguíneo, darão início ao ciclo sexuado ou esporogônico do ciclo no intestino médio do mosquito (55-56).

Ao realizar o repasto sanguíneo, mosquitos do gênero *Anopheles* ingerem os gametócitos femininos e masculinos, juntamente com as outras formas que são destruídas no estômago do mosquito. No intestino médio do mosquito, os gametócitos escapam dos eritrócitos. O gametócito macho se funde com a fêmea, formando um zigoto diploide. O zigoto se desenvolve em um oocineto móvel, que atravessa a matriz peritrófica e alcança a parede do intestino médio do mosquito e encista na camada epitelial e se aloja na membrana basal, onde perde a motilidade e secreta substâncias quitinosas da matriz peritrófica, como colágeno IV, formando o oocisto (56,57). No interior das células epiteliais o oocisto se multiplica por esporogônia

dando origem aos esporozoítos. Em torno de 9-14 dias ocorre a ruptura da parede do oocisto e liberação dos esporozoítos para a hemolinfa do mosquito. Carreados pela hemolinfa, os esporozoítos chegam a glândulas salivares, migram para o canal central da glândula salivar onde serão inoculados no hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (55-57).

1.4 O papel dos anticorpos na imunidade antimalárica

Indivíduos residentes em áreas de alta endemicidade de malária desenvolvem, após repetidas infecções, uma imunidade clínica denominada premunição (58). A premunição é adquirida gradualmente, o que explica a alta susceptibilidade da doença em crianças e viajantes que nunca tiveram malária ou mesmo nunca estiveram em áreas endêmicas de malária, o que requer anos de exposição contínua pra ser desenvolvida, entretanto, se um indivíduo semi-imune sai da área endêmica, essa imunidade protetora é perdida (59,60). Este estado de imunidade parcial não irá prevenir da reinfecção e indivíduos adultos podem apresentar infecções assintomáticas ao longo da sua vida (60). A imunidade antimalárica está associada tanto a resposta imune humoral, quanto celular. Acredita-se que a resposta imune celular seja essencial para controlar a infecção pré-eritrocítica, enquanto os anticorpos sejam primordiais para conter o estágio eritrocítico da doença (61,62).

Na fase pré-eritrocítica, os mecanismos efetores compreendem a citotoxicidade direta dos hepatócitos infectados promovida por células T CD8+ (linfócitos T citotóxicos – LTC ou CTL), já que os hepatócitos expressam antígenos de MHC classe I e possivelmente são induzidos a expressar os de classe II. Outras células como NK, NKT e $\gamma\delta$ T também eliminam parasitas intra-hepáticos através da secreção de interferons tipo I e IFN- γ . Outro importante mecanismo de defesa do organismo contra os plasmódios é a fagocitose de merozoítos livres e de hemácias parasitadas, que ocorre logo após cada esquizogonia, principalmente no baço. As células T helper CD4+ são importantes durante a fase eritrocítica e na produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam macrófagos. Tanto a produção de interferon gama (IFN) como de interleucinas (IL-4, IL-2, IL-5) e os radicais de oxigênio e nitrogênio produzidos pelos macrófagos ativados parecem ser os mediadores celulares que controlam a infecção por plasmódios. Essas células também são importantes para

mediar a ativação de células B, aumentando a resposta humoral. Outras células como as células NK e as células $\gamma\delta$ T também estão envolvidas na resposta imune. IFN- γ , perforina e granzima produzidas pelas células NK são responsáveis pela morte das hemácias infectadas por *P. falciparum*.

Os anticorpos possuem diversas funções efetoras e podem agir diretamente sobre o parasito ou em cooperação com células e moléculas do sistema imune do hospedeiro (Figura 6). Os anticorpos também podem agir sobre os parasitos durante o estágio pré-eritrocítico, entretanto, existem mais evidências de suas funções no decorrer da fase eritrocítica. Os anticorpos podem:

- i. Reduzir a travessia dos esporozoítos pela pele e a sua invasão aos hepatócitos (63),
- ii. Atuar opsonizando esporozoítos para promover a fagocitose (63),
- iii. Inibir a invasão do merozoíto ao eritrócito, o crescimento intraeritrocítico do parasito ou a ruptura do esquizonte e, conseqüentemente, a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea (63-65),
- iv. Opsonizar merozoítos e eritrócitos infectados para fagocitose, se ligando a antígenos de superfície de merozoítos e eritrócitos infectados, facilitando seu reconhecimento pelas células fagocíticas, levando a morte e remoção dos parasitos e células parasitadas (63,66-69),
- v. Através do mecanismo de inibição celular dependente de anticorpo (ADCI) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), onde os anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) se ligam a antígenos de superfície de merozoítos e interagem com os receptores Fc de monócitos para ADCI e células NK para ADCC, ativando-os e induzindo-os a liberarem fatores parasitostático e/ou citotóxicos, que impedem o desenvolvimento do parasito (63),
- vi. Através do mecanismo de explosão respiratória dependente de anticorpos (ADRB), onde os merozoítos opsonizados interagem com neutrófilos, ativando-os e induzindo-os à produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e seus intermediários e outros componentes tóxicos impedindo seu desenvolvimento intraeritrocítico (63),

- vii. Ativando o sistema complemento, através da ligação à superfície dos merozoítos e à primeira molécula da via clássica do complemento, C1q, ativando assim a cascata do sistema complemento acarretando na lise do merozoíto (70),
- viii. Inibindo a adesão de hemácias parasitadas ao endotélio vascular e a formação de rosetas, bloqueando o sequestro de eritrócitos infectados no endotélio vascular que está associada aos casos de malária grave (71),
- ix. Inibindo a ruptura de esquizontes e, conseqüentemente, a liberação de merozoítos, podendo reduzir a parasitemia (72),
- x. Neutralizando toxinas liberadas pelo parasito após a ruptura dos esquizontes, como Glicosilfosfatidilinositol (GPI), diminuindo as manifestações clínicas da doença (73).

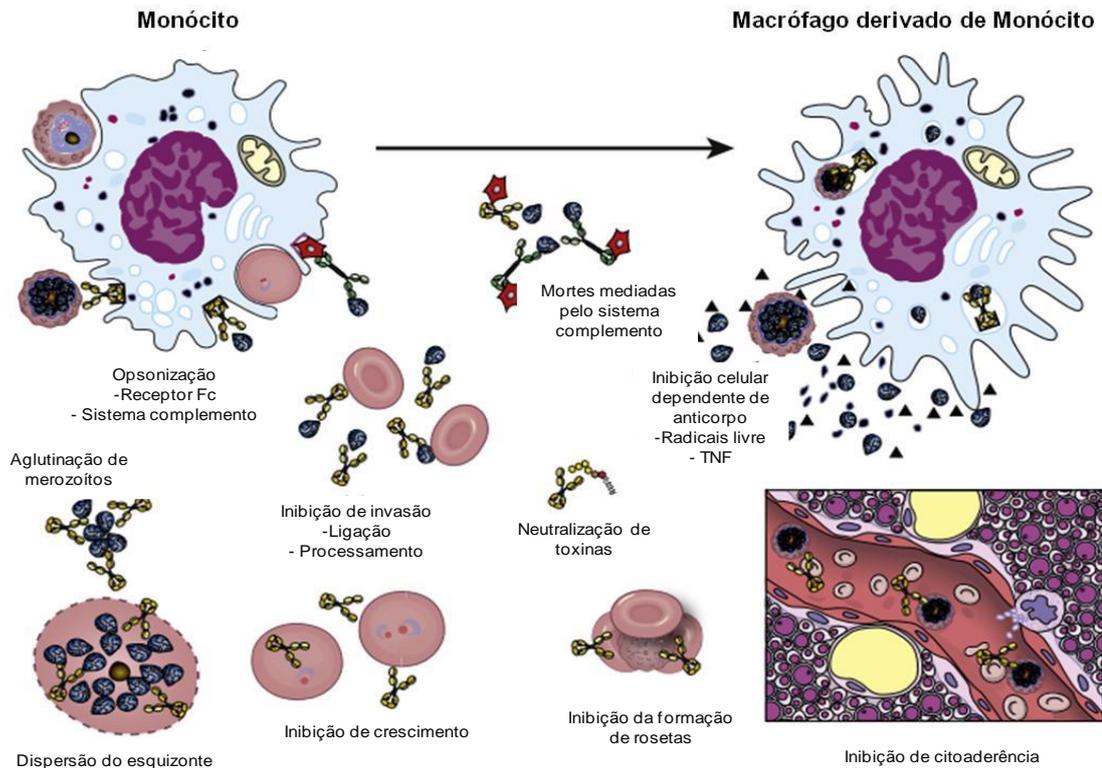


Figure 6. Representação esquemática de mecanismos por anticorpos na imunidade contra as formas eritrocíticas do *P. falciparum*. Anticorpos contra merozoítos podem: (i) prevenir a invasão de eritrócitos; (ii) ativar Sistema Complemento; (iii) Oponizar merozoítos e (iv) estimular monócitos e macrófagos para liberar moléculas parasitosáticas, matando parasitos intraeritrocíticos. Anticorpos contra eritrócitos infectados podem: (i) inibir a citoaderência, (ii) impedir a formação de rosetas, (iii) Oponizar eritrócitos infectados e (iv) inibir o desenvolvimento intracelular do parasito. TNF: Fator de Necrose Tumoral. Adaptado de Teo *et al.* (63) (2016).

Desde os experimentos de transferência passiva de imunoglobulinas (Igs) de indivíduos imunes à malária para indivíduos infectados não imunes, realizados por Cohen e McGregor nos anos 60, tem-se conhecimento que os anticorpos são componentes cruciais da imunidade naturalmente adquirida e que esses anticorpos são capazes proteger contra a infecção e/ou redução do risco de evolução da doença (74,75). A transferência de um *pool* de IgG imune, obtido a partir de soros de indivíduos de uma área hiperendêmica na Costa do Marfim, provocou a queda acentuada na parasitemia em pacientes tailandeses não imunes com resistência a cloroquina. Após a queda brusca, a parasitemia permaneceu no limite de detecção da

gota espessa enquanto a IgG imune estava presente no soro. Quando a IgG imune transferida foi naturalmente degradada, a parasitemia voltou a subir, e caiu drasticamente com a administração de nova dose da mesma IgG imune. Esses dados, demonstram claramente o papel dos anticorpos IgG na proteção contra a malária (75).

O perfil da resposta IgG também tem grande impacto no papel protetor contra a infecção visto que: (i) indivíduos protegidos da malária clínica possuem altos níveis de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) contra antígenos plasmodiais; (ii) quanto maior o grau de proteção desses indivíduos, maior é a razão entre anticorpos citofílicos e não citofílicos (IgG2 e IgG4) e; (iii) anticorpos não citofílicos podem bloquear o mecanismo efetor dos anticorpos citofílicos (76,77,78). Em concordância com a observação de que os anticorpos produzidos na resposta a infecção são de particular importância, estudos realizados com soros de indivíduos de área endêmica mostraram que existem diferenças na distribuição dos isotipos de imunoglobulinas antiplasmodiais em crianças (não imunes) e adultos (imunes). Os adultos imunes apresentam um balanço favorável a anticorpos citofílicos, IgG1 e IgG3, ao passo que nos indivíduos não imunes os anticorpos não citofílicos são predominantes (78). Curiosamente, as especificidades dos anticorpos nas duas populações (imunes e não imunes) não são muito diferentes, mostrando que, provavelmente, desde cedo os indivíduos respondem aos antígenos corretos, mas com qualidades de anticorpos diferentes. De fato, anticorpos não citofílicos além de não mediar proteção, competem pelos mesmos sítios que anticorpos citofílicos protetores e, estando predominantes, têm um efeito bloqueador dos mecanismos de proteção, como o ADCI.

Alguns estudos também têm demonstrado respostas IgM contra antígenos plasmodiais em populações expostas à malária e que essas respostas podem estar associadas a proteção contra a malária clínica (79,80). Um trabalho realizado na África Ocidental mostrou que o grupo étnico chamado Fulani é resistente a malária e apresenta uma maior amplitude e magnitude de anticorpos IgM específicos para antígenos de *P. falciparum* quando comparado ao grupo mais susceptível Dogon, enquanto não houve diferença na resposta IgG específica quando os dois grupos foram comparados (81). Estudos mais recentes mostraram que anticorpos IgM específicos contra antígenos de *P. falciparum* e de *P. vivax* podem mediar a fixação do complemento (82,83), e que IgM de indivíduos com previamente infectados pode

inibir a invasão de merozoito de *P. falciparum* no eritrócito *in vitro* na presença de complemento (82,83). Além disso, anticorpos IgM anti-merozoítos foram correlacionados com a proteção contra a malária em um estudo longitudinal com crianças (83). Esses dados demonstram que os anticorpos IgM também podem participar da proteção contra a malária.

O processo de invasão do merozoíto no interior do eritrócito envolve múltiplos passos, desde a ligação inicial, reorientação apical, até a formação de uma estreita junção seguida da entrada do merozoíto no eritrócito. Estão envolvidos nesse processo de invasão as Proteínas de Superfície de Merozoítos (MSPs), assim como outros antígenos que se ligam ao eritrócito (84,85,86). Esses antígenos, que ficam expostos ao sistema imune, são promissores candidatos a uma vacina antimerozoítos, pois os anticorpos têm o potencial de bloquear a infecção e conferir proteção (87). Recentes estudos têm mostrado que anticorpos contra esses antígenos de merozoítos são funcionais *in vivo* inibindo a invasão de merozoítos no eritrócito, opsonizando merozoítos por fagocitose e bloqueando o desenvolvimento intracelular do parasito (88-91). Estes estudos sugerem que a imunidade protetora contra a malária está associada a resposta anticorpo específica contra antígenos presentes na superfície de merozoítos e a identificação desses antígenos alvos de uma resposta imune protetora é fundamental para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica.

1.5 A busca por uma vacina contra o *P. falciparum*

As estratégias de controle da malária envolvem, principalmente, o combate ao vetor e o diagnóstico e o tratamento oportuno. Contudo, esforços em controlar a malária têm sido frustrados pela biologia complexa do parasito e de seus vetores invertebrados, a existência de linhagens resistentes a drogas disponíveis (Mulenga et al, 2005), bem como estratégias sofisticadas de evasão do sistema imune durante o estágio intraeritrocítico. Dessa forma, a busca por uma vacina antimalárica se torna a estratégia mais viável para substancialmente reduzir a morbidade e mortalidade dessa doença e caminhar para uma possível eliminação da malária no mundo (92-97).

Atualmente, mais de 70 formulações, de vacina contra *P. falciparum* estão sendo testadas, e, 23 desta encontram-se em fase clínica (98). Uma vacina eficaz e segura contra a malária poderá ser uma importante ferramenta para combater a enorme carga socioeconômica causada pela malária (99). Uma vacina que possa prevenir a infecção humana e também a transmissão do humano ao mosquito poderá reduzir a morbidade e a mortalidade da malária e, eventualmente, acelerar a erradicação da malária global (100). Os parasitos têm um ciclo de vida complexo tanto no hospedeiro vertebrado quanto no hospedeiro invertebrado. Durante seu ciclo evolutivo, os plasmódios passam por diferentes estágios de desenvolvimento, expressando uma variedade de antígenos característicos de cada fase, capazes de induzir respostas imunes distintas (88,89). Essa complexidade gera um grande número de antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica capaz de induzir uma resposta imune protetora. Além disso, a recombinação homóloga que ocorre na gametogênese também pode ocasionar no aumento significativo de variabilidade genética da progênie facilitando a evasão do parasita do sistema imunológico do hospedeiro (90,101). Por isso, diferentes braços do sistema imune são requeridos para os diferentes estágios do parasito (102).

As vacinas da malária são classificadas pelo estágio-alvo de desenvolvimento do parasito: vacina contra estágio pré-eritrocítico, vacina contra estágio eritrocítico assexual e vacina contra estágio eritrocítico sexual (vacina bloqueadora de transmissão) (103,104).

O primeiro alvo é o estágio pré-eritrocítico, no qual os esporozoítos viajam pelo sangue até infectarem e se multiplicarem nos hepatócitos. O propósito do desenvolvimento de uma vacina contra as formas pré-eritrocíticas é impedir a penetração do esporozoíto no hepatócito e o desenvolvimento intracelular do parasito e, assim, inibir a liberação dos merozoítos e a consequente invasão nos eritrócitos através de uma resposta de anticorpos que impediria a migração dos esporozoítos até o fígado e a penetração no hepatócito, ou de células T que destruiriam os hepatócitos infectados (104,105). Tais vacinas poderiam prevenir tanto o desenvolvimento da doença, visto que os sintomas clínicos só se manifestam durante a fase eritrocítica, quanto à transmissão da malária, já que não haveria a formação de gametócitos.

O segundo alvo para candidatos vacinais é o estágio eritrocítico, que se inicia com a ruptura dos hepatócitos e consequente liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, sendo a única etapa do ciclo responsável pelos sintomas da malária (105). Esta vacina poderia impedir a penetração de merozoítos nas hemácias, o desenvolvimento intraeritrocitário do parasito, a ruptura do eritrócito parasitado e a consequente liberação dos merozoítos nas hemácias e a adesão de hemácias parasitadas ao endotélio vascular, implicada no desenvolvimento de malária cerebral. Espera-se que uma vacina contra o estágio eritrocítico seja capaz de conter ou até mesmo prevenir o processo da doença através da diminuição da carga parasitária, tendo impacto direto na morbidade e mortalidade da malária em áreas endêmicas através da indução de anticorpos que bloqueariam a ligação dos eritrócitos a células endoteliais, promovendo a opsonização de merozoítos e a fagocitose de eritrócitos infectados (105,106).

O terceiro alvo são as formas sexuadas do parasito, gametas, zigotos e oocinetos, compondo as chamadas vacinas bloqueadoras de transmissão. Essa modalidade visa a interrupção da transmissão parasitária entre humanos e o inseto vetor através da indução de anticorpos contra antígenos presentes nos estágios sexuais do parasita (107). Os anticorpos seriam ingeridos pelo mosquito no momento do repasto sanguíneo e impediriam o desenvolvimento parasitário dentro do intestino da fêmea do mosquito prevenindo a fertilização e a transição do oocineto a oocisto, interrompendo a geração seguinte das infecções de esporozoítos. Uma vacina com o objetivo de induzir uma resposta imune contra as formas sexuais não seria capaz de proteger o indivíduo vacinado de adquirir uma infecção, mas impede que o parasito se desenvolva no vetor, havendo a diminuição do número de mosquitos infectantes circulando em uma área e, consequentemente, a diminuição ou bloqueio da transmissão em uma determinada comunidade, como outras vacinas fazem através da imunidade de rebanho. Esse tipo vacina também é chamado de “vacina altruísta” ou “vacina solidária” pois não confere proteção diretamente para o indivíduo vacinado, mas sim na população receptora, no entanto a vacina precisaria ser aplicada em toda população para efetivamente bloquear a transmissão (106,107).

Outra abordagem é a vacina contra toxinas, as denominadas vacinas antidoenças, visto que não agem sobre o desenvolvimento do parasito, somente nas manifestações clínicas. Uma vacina capaz de bloquear as toxinas liberadas pelos

parasitos poderia minimizar ou até mesmo evitar os sintomas da malária e, conseqüentemente, os casos mais graves da doença. No entanto, esse tipo de vacina deve ser utilizado numa estratégia conjunta com uma vacina antiparasitária, pois o aumento da parasitemia, mesmo na ausência dos sintomas clínicos podem levar conseqüências graves ao indivíduo que contraia a infecção (73).

Os primeiros indícios de que o desenvolvimento de uma vacina antimalárica seria possível partiu de experimentos realizados por Nussenzweig e colaboradores na década de 1960 demonstraram que camundongos imunizados com esporozoítos irradiados desenvolviam imunidade protetora contra o desafio com esporozoítos não irradiados (107). Isso foi observado em primatas desafiados com *P. knowlesi* (108) e em humanos com *P. falciparum* e *P. vivax* (109). Entretanto, a utilização de esporozoítos irradiados para vacinação em massa era inviável até pouco tempo atrás (110), visto que para a realização de ensaios de ampla magnitude eram necessários que um grande número de esporozoítos fossem dissecados das glândulas salivares dos mosquitos, purificados, criopreservados e, subseqüentemente, administrados. Com os avanços tecnológicos, em 2010, a empresa Sanaria introduziu uma plataforma tecnológica que envolve a colheita de esporozoítas das glândulas salivares de mosquitos assépticos infectados por parasitas cultivados em laboratório, seguida de purificação, envasamento e criopreservação no nitrogênio líquido. Esse desenvolvimento viabilizou a utilização de esporozoítos irradiados como vacina.

Idealmente, uma vacina deverá prevenir os primeiros estágios do desenvolvimento do parasito, interrompendo os demais estágios e prevenindo a transmissão e, nesse caso, as vacinas dirigidas contra antígenos expressos no estágio pré-eritrocítico são consideradas mais efetivas que outros estágios do parasito (99,101). Entretanto, esta abordagem requer o bloqueio de 100% visto que se um único parasito invadir o fígado, se desenvolver e for liberado em circulação poderia causar doenças (111). Assim, vários antígenos tem sido identificados e considerados como candidatos a entrarem na composição de uma vacina antimalárica individualmente ou em conjunto com outros candidatos vacinais do mesmo estágio ou diferentes estágios de desenvolvimento do ciclo (vacina multi-estágio).

Para melhor compreensão da descrição dos antígenos plasmodiais candidatos a vacina, cabe fazer um breve detalhamento dos ensaios clínicos vacinais. Os ensaios clínicos vacinais avaliam a segurança e eficácia de uma candidata a vacina e,

são divididos em quatro diferentes fases: I, II, III e IV (112). Durante a Fase I a inocuidade e imunogenicidade da formulação são avaliadas, assim como o tipo de resposta imune induzida e as doses e intervalos a serem utilizados (112). Nessa fase, a formulação é administrada em poucos indivíduos residentes de áreas não endêmicas (Fase Ia) ou previamente expostos a malária residentes em áreas endêmicas (Fase Ib) (113). Se a formulação for segura, segue para os ensaios clínicos de Fase II, onde a eficácia da vacina contra a infecção ou doença é avaliada. A Fase II é dividida em Fase IIa e IIb. Na Fase IIa indivíduos residentes em áreas não endêmicas, sem exposição previa a malária, após imunização, são desafiados através da picada de mosquitos de laboratório carregando esporozoítos em suas glândulas salivares e sua eficácia é avaliada pela capacidade do indivíduo evitar ou retardar a infecção. Ao primeiro sinal de infecção, os voluntários são rapidamente tratados com antimaláricos. Na Fase IIb, um limitado número de indivíduos residentes em áreas endêmicas é exposto ao desafio natural após imunização e sua eficácia é avaliada pela capacidade dos indivíduos evitarem a infecção ou possuírem menos infecções, em um determinado período, em relação a um grupo controle não vacinado (114). As candidatas vacinais que obtiverem sucesso nessa fase seguem para os ensaios clínicos de Fase III. Durante a Fase III a eficácia é avaliada em larga escala. Nessa fase, uma determinada população de área endêmica é imunizada e a eficácia da vacina é avaliada pela porcentagem da redução na incidência (de doença ou infecção) em relação a uma população não vacinada vivendo sob as mesmas condições epidemiológicas (113,114). A eficácia de uma vacina pode variar em diferentes cenários epidemiológicos, assim se torna necessário a realização de ensaios clínicos em diferentes regiões, evidenciando a segurança e eficácia para licenciamento da vacina (114). A Fase IV envolve o monitoramento de segurança, eficácia e longevidade da proteção (114). Nessa fase, a vacina será administrada em populações maiores, provavelmente associada a outras vacinas, para possíveis interferências serem avaliadas de maneira apropriada.

Dentre as vacinas candidatas no estágio pré-eritrocítico, a RTS,S/AS01 (Mosquirix™) é a que está em estágio mais avançado (115). A RTS,S é a primeira vacina de malária a ser testada em ensaios clínicos de fase III e foi recentemente recomendada pelo OMS para uso generalizado em crianças na África Subsaariana e em outras regiões com transmissão moderada a alta de *P. falciparum* (116). A RTS,S é um antígeno recombinante composto da sequência conservada das cepas de

laboratório 3D7 de *P. falciparum*, que consiste na porção “R” (Repeat), que é uma simples cadeia de polipeptídeos que corresponde ao tandem altamente conservado da sequência de CSP do tetrapeptídeo na região repetitiva central (constituída por repetições dos aminoácidos Asparagina, Alanina, Asparagina, Prolina - NANP – epítipo imunodominante de célula B) e a porção “T” (T-Cell epitope) da região C-terminal (incluindo epítopos de célula T) da CSP fusionada a região N-terminal do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), o “S” (Surface) e uma porção HBsAg livre, expressos em *Saccharomyces cerevisiae* (117). A segunda porção “S” não é fusionada ao HBsAg. A sequência proteica da CSP fundida ao vírus da Hepatite B atua como uma matriz para transportar antígenos centrais de repetição da região CS e um adjuvante, o AS01, que é um lipídio monofosforil A e o saponin QS21 de *Quillaja saponaria* (115). A RTS,S/AS01 induziu uma forte resposta do anticorpo IgG contra a região conservada repetitiva da proteína CS e uma potente resposta da célula T (CD4+). Porém, a imogenidade é de vida curta e precisa de uma dose adicional de reforço. A RTS,S demonstrou uma prevenção de 35% e 49% para episódios de malária clínica e malária severa, respectivamente, ambos de curta duração em áreas de alta endemicidade de malária (104,115,116,117). Apesar da modesta eficácia da vacina, ela foi capaz de prevenir de 6% a 30% a mortalidade de crianças com menos de 5 anos em áreas endêmicas, com significativo benefício de saúde pública e custo-efetividade em áreas de alta prevalência (104). Estudos de implantação piloto estão em andamento em Ghana, Kenya e Malawi, com a inclusão no calendário de vacinação em bebês, incluindo uma quarta dose de reforço 18 meses após a terceira dose (115).

Outra vacina baseada no estágio pré-eritrocítico do *P. falciparum* é a vacina composta por esporozoítas atenuadas denominada PfSPZ. Os esporozoítas são atenuados por diferentes abordagens para preparar o produto candidato a vacina: atenuação da radiação (chamada Vacina PfSPZ), atenuação química obtida *in vivo* pela administração concomitante de drogas antimaláricas (chamada PfSPZ-CVac para vacinação quimioprolática), ou atenuação genética pela deleção dos genes necessários para completar o desenvolvimento hepático (chamada PfSPZ-GA1 para o primeiro candidato PfSPZ geneticamente atenuado (NCT03163121)). Ensaios clínicos demonstraram que a imunização com esporozoítas atenuados irradiados induziu altos níveis de proteção estéril (80%) em ensaio controlado de infecção com malária

humana (CHMI) com parasitos homólogos (118-121) e que quatro doses conferiram 55% de proteção estéril, até 14 meses após a última imunização (108).

Outra estratégia vacinal para este estágio inclui a ME-TRAP (*multiple epitope thrombospondin-related adhesion protein*), que consiste numa fusão de epítomos de Célula B, Célula T CD4 e CD8 de diversos antígenos pré-eritrocíticos de *P. falciparum* fusionados ao alelo T9/96 da TRAP, codificada nos vetores Adenovírus simiano sorotipo 63 (ChAd63) e vírus vaccínia Ankara modificado (MVA). Essa vacina se mostrou segura e imunogênica, capaz de induzir resposta celular em indivíduos sem histórico de malária (122,123) e uma eficácia de 67% contra a infecção malárica, entretanto essa proteção foi parcial.

Outros candidatos vacinais de estágio pré-eritrocítico vêm sendo estudados e testados. Um novo antígeno, a proteína de célula transversal para oocinetos e esporozoítos (CelTos) tem sido identificado como uma proteína essencial para ser transversal, tanto em mamíferos quanto em mosquitos e, em murinos, vem induzindo completa proteção estéril contra esporozoítos (73,124,125). Os antígenos do estágio hepático – 1 (LSA), LSA-2, LSA-3 também foram incluídos como candidatos vacinais. Estudos mostraram que imunização com LSA-1 foi segura e imunogênica e provocam altos títulos de anticorpos específicos e de IFN-gama e IL-2 CD4+ T. Ensaios clínicos da vacina LSA-1 vem sendo investigado e LSA-3 tem sido objeto de estudo em ensaios pré-clínicos (126).

As vacinas do estágio eritrocítico provocam respostas anti-invasão e antidoenças (73). A aquisição de anticorpos no soro contra merozoítos e eritrócitos infectados estão associados com a reduzida susceptibilidade a malária. Atualmente diversos antígenos de fase eritrocítica compõem vacinas que estão sendo utilizada em ensaios vacinais. Uma dessas vacinas é a GMZ2, que contém fragmentos das proteínas GLURP e MSP-3 de *P. falciparum*. A GLURP é expressa durante todo o estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro vertebrado enquanto a MSP-3 é expressa nos merozoítos. Ensaios clínicos têm demonstrado que a GMZ2 é bem tolerada, segura e imunogênica e que os elevados títulos de anticorpos IgG induzidos após imunização são específicos e funcionais, capazes de controlar o crescimento *in vitro* de *P. falciparum* em presença de monócitos (127,128). Além disso, foram demonstrados alta prevalência e títulos de anticorpos naturalmente adquiridos contra

a GMZ2 e seus componentes em indivíduos residentes em área de alta endemicidade de malária na África (129,130). Ensaios clínicos tem demonstrado a baixa eficácia de GMZ2, entretanto, pode ter um grande impacto no combate a malária, principalmente se combinada a uma candidata bloqueadora de transmissão (131-135).

Outra candidata a vacina antimalárica contra fase eritrocítica é a MSP3-LSP que está atualmente, está em ensaios clínicos de Fase IIb. A MSP3-LSP é derivada da região C-terminal da Proteína-3 de Superfície do Merozoíto. Essa candidata vacinal demonstrou ser segura e imunogênica em indivíduos sem histórico de malária (136), adultos semi-ímmunes e crianças residentes em áreas endêmicas. Ensaios clínicos revelaram que a MSP3-LSP induziu altos níveis de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3), capazes de inibir o crescimento do parasito *in vitro* e *in vivo* (127,133-136).

Algumas proteínas de superfície de merozoíto têm sido identificadas como alvo dos anticorpos que inibem a invasão no eritrócito e são consideradas candidatas a vacina. Essas incluem as Proteínas de Superfície de Merozoíto-1 (MSP-1), MSP-2 e MSP-3, Antígeno Rico em Serina (SERA), Antígenos de Ligação ao Eritrócito, Antígeno de Superfície de Eritrócito infectado com Anel (RESA) e Antígeno de Membrana Apical (AMA1). A imunização de crianças com a proteína AMA-1 em adjuvante ASO mostrou uma eficácia cepa-específica de 60% (84). Outro estudo mostrou que a imunização com AMA-1 em associação com a Proteína RON2L (Rhoptry neck protein 2) melhora a imunogenicidade de alguns epítomos preservados de AMA1 (85,136). Outro ensaio clínico de fase 1 utilizando a MSP-1 com o adenovírus de chimpanzé recombinante (ChAd63) e o vetores baseados no vírus da vacina modificada (MVA) induziu resposta anticorpo específica contra *Pf*MSP1 (122,136,137). Outra candidata a vacina contra fase sanguínea atualmente é a *Pf*Rh5, parte de uma família de proteínas conhecidas como Proteína Homóloga de Ligação ao Reticulócito, uma proteína merozoíto essencial para a invasão nos eritrócitos. A primeira geração desta vacina está sendo testada em ensaios clínicos em Oxford e Tanzânia e estudos mostraram que anticorpos contra *Pf*RH5 neutralizam merozoítos *in vitro* e parecem ser cepa transcendente (138). Um outro antígeno promissor é o *Schizont Egress Antigen-1* (SEA-1), um antígeno do parasito expresso nas células eritrocíticas infectadas por esquizonte, que é essencial para a ruptura no estágio eritrocítico. Anticorpos contra *Pf*SEA-1 estão associados com a redução da malária

grave. Não se sabe ainda se anticorpos antiPfSEA poderão também bloquear a saída do esquizonte (72).

Acredita-se que os casos de fatalidade ocasionados pela doença resulte em parte das reações patológicas induzidas por toxinas liberadas pelo *P. falciparum* por ocasião da ruptura dos eritrócitos ao final do ciclo eritrocítico. Assim, anticorpos contra essas toxinas também podem proteger contra a doença induzida pelo *P. falciparum*. Imunização com sintéticos de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) produz anticorpos anti-GPI capazes de neutralizar GPI resultando na sobrevivência do indivíduo (139,140).

Os principais antígenos candidatos a vacina bloqueadora de transmissão são Pfs230 e Pfs48/45, antígenos cuja expressão se inicia no gametócito intracelular no hospedeiro vertebrado, e Pfs25 e Pfs28, antígenos cuja expressão se inicia no gametócito extracelular no hospedeiro invertebrado. O antígeno de oocineto Pfs25 expresso em *S. cerevisiae* tem mostrado uma moderada imunogenicidade e níveis subótimo de atividade bloqueadora de transmissão em ensaios clínicos de Fase Ia (141-143). Um dos problemas enfrentados na abordagem com vacinas bloqueadoras de transmissão é a ausência de reforço natural seguido a imunização, o que poderia limitar a sua eficácia (142,143).

Tabela 1. Principais antígenos plasmodiais candidatos à vacina antimalárica

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

Fonte: Adaptado de Baptista (135) (2017)

Embora muitos antígenos tenham sido identificados como alvos vacinais e tenham sido testados em ensaios pré-clínicos e clínicos nenhum deles gerou uma perspectiva sólida de que uma vacina eficaz e de efeito duradouro possa estar disponível nos próximos anos (144-146), tornando, assim, importante a busca de novos candidatos vacinais. Nesse contexto, as Proteínas de Superfície do Merozoíto de Ligação ao Duffy 1 e 2 (MSPDBL-1 e a MSPDBL-2) de *Plasmodium falciparum* se apresentam como candidatas promissoras.

1.6 A superfície de merozoíto e as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2

Os merozoítos representam um importante alvo vacinal porque estão expostos ao sistema imune do hospedeiro antes da invasão no eritrócito. O contato inicial entre o merozoíto e o eritrócito é um passo crucial, pois o parasito deve distinguir entre os eritrócitos competentes para invasão e outros tipos de célula (147-149). Assim, vários antígenos expostos na superfície do merozoíto tem sido caracterizado visando uma melhor compreensão do ciclo evolutivo do *Plasmodium* e a identificação de antígenos que possam ser caracterizados com os alvos vacinais (150,151).

A superfície do merozoíto é constituído principalmente por proteínas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo a Proteína de Superfície do Merozoíto (MSP) -1 a mais abundante (152,153). A MSP-1 é sintetizada no estágio esquizonte como um precursor de aproximadamente 195 kDa. Ao final da esquizogonia, a MSP-1 é clivada proteoliticamente dando origem a polipeptídios de tamanhos variados. Alguns desses polipeptídios se associam a outras proteínas da superfície do merozoíto, como a MSP-7 e a MSP-6, e formam um complexo não covalente que é transportado para a superfície (153,154). Esse complexo consiste em 4 polipeptídios de MSP-1 clivados, que são nomeados de acordo com o seu peso molecular: um fragmento de 83 kDa (MSP-1₈₃), dois fragmentos de 30 e 38 kDa (MSP-1₃₀ e MSP-1₃₈) e um fragmento de 42 kDa (MSP-1₄₂). Após a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, ocorre um segundo processamento, no qual o polipeptídio de 42 kDa é clivado por uma segunda protease e resulta em dois fragmentos menores, um de 33 kDa (MSP-1₃₃) e outro de 19 kDa (MSP-1₁₉). O fragmento MSP-1₃₃ é liberado na corrente sanguínea ao passo que o fragmento C- terminal MSP-1₁₉ é ancorado na membrana do merozoíto via GPI (155).

Acredita-se que a MSP-1 tenha papel importante na invasão do merozoíto no eritrócito, visto que o receptor do fragmento MSP-1₁₉ é a Banda 3, uma proteína abundantemente presente na membrana do eritrócito (154). Adicionalmente, o fragmento MSP-1₈₃ interage com a glicoforina A (GPA) que também é abundante na superfície do eritrócito, sugerindo um modelo de invasão em que as múltiplas subunidades da MSP-1 se ligam ao complexo GPA – banda 3 na superfície da célula no momento inicial da invasão (155).

Outras proteínas de superfície de merozoíto não apresentam domínio transmembrana aparente ou motivos ancorados de GPI, presumindo-se que estejam associadas extrinsecamente pela ligação direta com proteínas na superfície do parasito (Figura 7). Entre as proteínas que não possuem ancoramento por GPI ou domínio transmembrana estão membros da família MSP-3 (155,156).

A família MSP3 consiste em um grupo de antígenos codificados por genes no cromossomo 10. Os membros da família MSP-3 são caracterizados por um domínio SPAM (Antígeno Polimórfico Secretado Associado com Merozoítos) na sua região C-terminal, que contém uma região rica em ácido glutâmico seguida de uma sequência *Leucine Zipper-Like* (LLZ). A região SPAM é conservada entre os membros da família e em isolados de campo, resultando na indução de anticorpos com reatividade cruzada (152).

Dois membros da família MSP3 apresentam características que os diferenciam do resto das proteínas dessa família. Além do domínio C-terminal SPAM, eles possuem uma região rica em cisteína, o domínio *Duffy Binding-Like* (DBL). Da mesma forma que a Proteína de Ligação *Duffy* em *P. vivax* e que *Erythrocyte Binding Antigen-175* (EBA-175), EBA-140 e EBA-181 em *P. falciparum*, antígenos que se ligam a receptores sobre eritrócito e medeiam a invasão, a DBL de MSPDBL-1 e MSPDBL-2 pode se ligar a receptores desconhecidos na superfície de eritrócito, sugerindo seu papel no processo de invasão (157,158). Essas duas proteínas estão colocalizadas no estágio esquizonte maduro num modelo de “cacho de uvas” (156) consistente com sua presença sobre a superfície do merozoíto, e foi observado que MSPDBL-1 estava localizada sobre a superfície de merozoíto e MSPDBL-2 tem localização similar, embora apareça mais concentrado na região final apical (156-158). As proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são parte de um amplo complexo de MSP1. Elas se ligam diretamente a superfície do eritrócito, demonstrando que o complexo MSP-1 atua como uma plataforma que mostra estas duas proteínas sobre a superfície de merozoítos para se ligar a receptores de eritrócitos e realizar invasão (158,159) (Figuras 7, 8). Estudos sugerem que os ligantes de invasão, assim como antígenos expressos na superfície do merozoíto em *P. falciparum* constituem importantes candidatos a vacina (159).

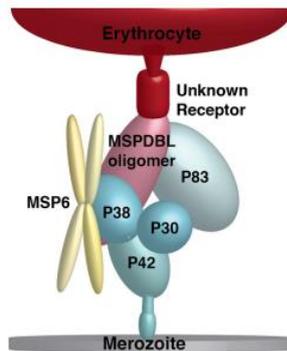


Figura 7. MSPDBL-1 e MSPDBL-2 formam um complexo com MSP-1 que medeia a interação com o eritrócito durante a invasão. Fonte: Lin (154) (2014).

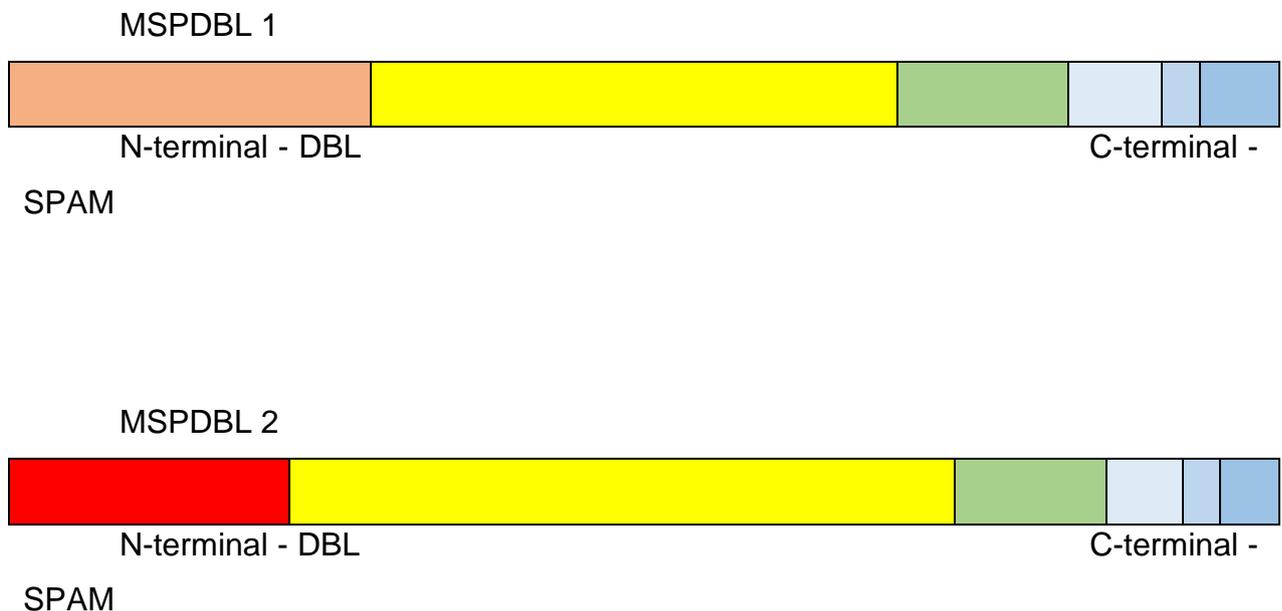


Figura 8. Representação esquemática das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2. Criado pela autora adaptado do artigo Tetteh (156).

Análises de população genômica revelaram muitos polimorfismos em ambos os genes, principalmente nos domínios DBL, consistente com o fato desses genes estarem sob forte seleção balanceadora, tipo de seleção que mantém diferentes alelos dentro de uma população, um indicativo de que essas proteínas estejam sofrendo intensa pressão imunológica, concordante com a sua presença na superfície do merozoíte (159). Muitas dessas mutações são dimórficas *in natura*, com, aproximadamente 10-20% dos aminoácidos mutantes envolvendo uma mudança na polaridade. Apesar desses altos níveis de diversidade, estudos recentes revelam que anticorpos específicos para o domínio DBL de MSPDBL-2 são adquiridos

naturalmente e estão associados com a redução do risco da malária. Recentemente, foi demonstrado que polimorfismos de nucleotídeos simples (SNP) na região DBL de MSPDBL-2 está associado com o aumento da resistência ao holofantrina, mefloquina e lumefantrina (160,161).

Embora essas proteínas apresentem um perfil polimórfico, estudos realizados em áreas de alta endemicidade de malária mostraram que anticorpos contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão associados com proteção contra a malária clínica, contra altas parasitemias e são capazes de inibir o crescimento do *P. falciparum in vitro*, sugerindo um importante papel na imunidade antimalárica (157-159).

Considerando as diferenças genéticas entre os parasitos circulantes e a população exposta, avaliar a resposta imune contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em populações residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária, com diferentes cenários epidemiológicos, podem gerar dados que ressaltem o potencial dessas proteínas como candidatas a vacina antimalárica.

1.7 Justificativa

As proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão presentes na superfície dos merozoítos e participam do processo de invasão no eritrócito. Estudos realizados em áreas de alta endemicidade de malária mostraram que essas proteínas podem participar do processo de imunidade antimalárica visto que anticorpos contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão associados com proteção contra malária clínica e que esses anticorpos naturalmente adquiridos são capazes de inibir o crescimento do *P. falciparum in vitro*. Considerando que os parasitos que circulam no Brasil e as populações expostas podem apresentar características genéticas diferentes de outras áreas endêmicas, é importante a realização de estudos que possam contribuir para um melhor entendimento da resposta imune naturalmente adquirida para os antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica, visto que a eficácia de uma vacina pode variar em diferentes cenários epidemiológicos.

No presente trabalho, propomos avaliar o perfil da resposta imune humoral contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *P. falciparum* em indivíduos naturalmente expostos residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária com diferentes níveis de endemicidade. Esse é o primeiro trabalho que avalia a resposta imune naturalmente adquirida contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em áreas endêmicas brasileiras de malária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil da resposta imune humoral contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *P. falciparum* em populações naturalmente expostas à malária da Amazônia Brasileira.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a resposta anticorpo dirigida às proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *P. falciparum* em residentes de áreas endêmicas brasileiras de malária.
- Avaliar a relevância das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 no processo de aquisição de uma imunidade antimalárica, pela análise das classes e subclasses de anticorpos e pelos dados clínicos e epidemiológicos.
- Identificar os epítomos B imunodominantes das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de *P. falciparum* nas populações estudadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição das áreas estudadas

O estudo foi realizado em cidades pertencentes aos estados do Amazonas e do Acre. O estado do Acre está localizado no sudoeste da Amazônia e ocupa uma área de 164.221,36 Km² e essa extensão territorial corresponde a 4% da região Amazônica Brasileira e a 1,9% do território nacional. O estado do Amazonas está situado na região norte é o estado de maior extensão territorial e apresenta uma área de 1.570.745,680 Km², que representa 18,5% do território nacional. A região é influenciada pelo clima tropical quente e úmido, com a temperatura média 31,4° C e estação das chuvas no período entre dezembro e maio.

Um estudo de coorte transversal foi realizado de junho a agosto de 2016 em três áreas endêmicas da Amazônia brasileira. Duas destas áreas, Cruzeiro do Sul (07°37'50"S/72°40'13"O) e Mâncio Lima (07°36'49"S/72°53'47"O) são áreas de alto risco situadas no Vale Juruá, estado do Acre, e correspondem, respectivamente, aos 3º e 6º principais "hotspots" (Os pontos críticos que constituem o principal reservatório para a transmissão da malária residual, com maior incidência de malária do que as áreas vizinhas e, portanto, têm o potencial de formar ângulo para estratégias de intervenção bem sucedidas), entre os 17 municípios que concentram 80% da transmissão da malária *P. falciparum* em toda a Amazônia. O município de Guajará (02°58'18"S/57°40'38"O), uma área de médio risco no estado do Amazonas, foi também incluído (Figura 9).

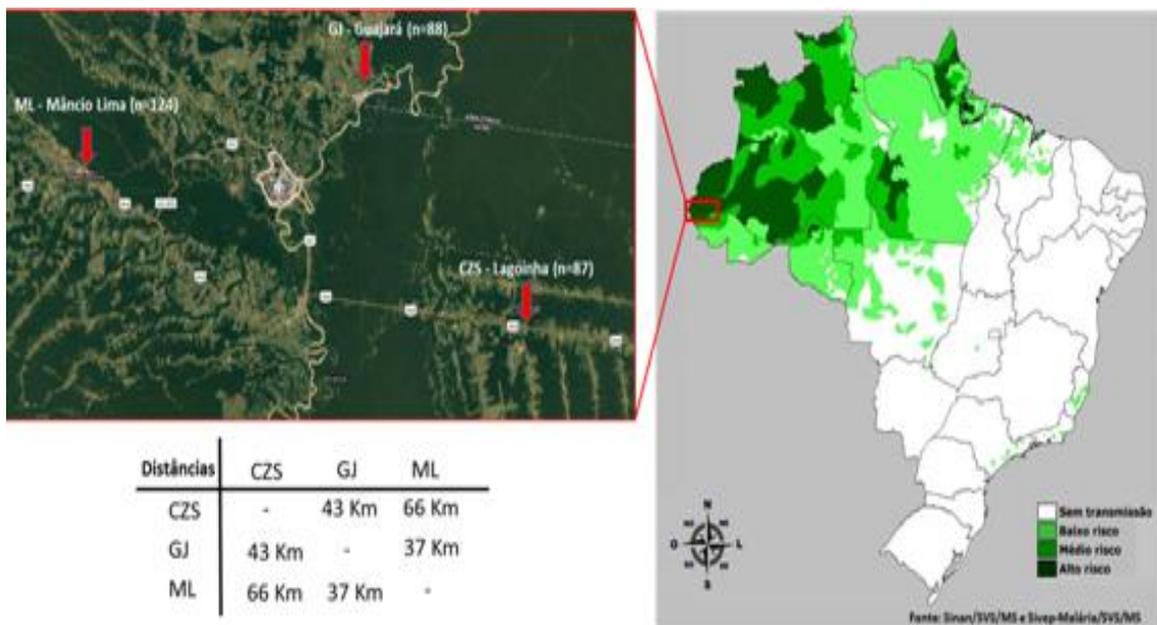


Figura 9. Destaque das áreas de Cruzeiro de Sul, Mâncio Lima e Guajará, Matos (162) (2019).

Em 2016, ano da coleta das amostras, Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará registraram 5447, 1432, 674 casos de malária *falciparum* e Incidência Parasitária Anual (IPA) de 85.3, 67.3, 43.3 para malária. Historicamente, a IPA de malária no Brasil é um indicador destinado ao monitoramento da região amazônica, enquanto para a região extra-amazônica utiliza-se, principalmente, o monitoramento de número de casos absolutos e ocorrência de surtos.

3.2 Voluntários

Foram coletadas 299 amostras de indivíduos de três diferentes áreas: Cruzeiro do Sul (AM) (n= 124), Mâncio Lima (AM) (n= 88) e Guajará (AC) (n= 87). Também foram coletadas amostras de indivíduos que residem nas áreas de estudo sem história pregressa de malária para fazer parte do grupo controle (CO) (n= 53). As amostras de sangue coletadas e os dados pessoais e epidemiológicos dos participantes da pesquisa foram consentidos por escrito pelos voluntários.

O trabalho de campo foi realizado com o apoio da Coordenação de Endemias de Cruzeiro do Sul, de Mâncio Lima e de Guajará no período de junho a agosto de 2016. Em Mâncio Lima, indivíduos que procuravam assistência médica no Hospital Dr. Abel Pinheiro Maciel Filho foram convidados a participar do estudo. Além da busca passiva, também foi realizada busca ativa em colaboração com a equipe de agentes de saúde da Unidade de Saúde da Família Sofia de Almeida Barreto. Em Cruzeiro do Sul foram realizadas busca ativa – em colaboração com os Agentes de Saúde – e passiva dos pacientes que procuravam assistência na Unidade de Saúde Gilmar Cândido da Silva, localizado em Lagoinha. Em Guajará, a busca foi exclusivamente ativa, também com o apoio dos Agentes de Saúde do local.

Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários:

Critério de inclusão:

Todos os indivíduos residentes nas localidades acima descritas que aceitaram participar de nosso estudo, independente de apresentarem ou não sintomas de malária.

Critério de exclusão:

Foram excluídos de nosso estudo populações indígenas, grupos religiosos, militares, presidiários, doentes mentais, parturientes e gestantes, além de crianças abaixo de 12 anos de idade.

Comitê de ética

Esse projeto e seu termo de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248) (Anexo I).

3.3 Coleta de dados pessoais e epidemiológicos

As coletas foram realizadas por meio de visitas domiciliares (busca ativa) ou por busca passiva. Durante as visitas, os indivíduos foram informados sobre as formas de

transmissão da malária e medidas profiláticas. O projeto foi explicado ao indivíduo, ressaltando que a sua participação era de livre e de espontânea vontade sem prejuízo para seu atendimento ou tratamento. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo leram e foram informados do conteúdo do termo de consentimento. Após consentimento dos indivíduos, foi obtida uma autorização por escrito de todos os voluntários (Anexo II) ou de seus responsáveis, caso menor de idade (Anexo III). Após a assinatura, todos os voluntários participaram de uma entrevista com o objetivo de preencher um questionário de investigação para a coleta de dados pessoais e epidemiológicos (Anexo IV).

3.4 Coleta de sangue

Após a coleta dos dados pessoais e epidemiológicos e da obtenção do consentimento, aproximadamente 20 mL de sangue foram coletados por via endovenosa em tubos Vacutainer com heparina ou com EDTA (Becton & Dickinson). As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas antes do início do tratamento (D0) e após o término do tratamento (D15), em caso de indivíduos com diagnóstico positivo de malária por *P. falciparum*. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 min e os plasmas correspondentes foram aliquotados e estocados a -20°C até o momento do uso. As amostras coletadas em tubos com EDTA foram criopreservadas utilizando o mesmo volume da solução criopreservadora glicerolyte (0.9% NaCl, 4.2% sorbitol, 20% glicerol, *Sigma*) e, então, estocadas a -70°C até o momento do uso. No total, foram coletadas 352 amostras: 124 amostras de Cruzeiro do Sul, 88 amostras de Mâncio Lima, e 87 amostras de Guajará. Também foram coletadas 53 amostras de indivíduos que residem nas áreas estudadas sem histórico de malária (controles de área) (Anexo V).

3.5 Diagnóstico de malária

Na ocasião da coleta foram confeccionadas lâminas de distensão sanguínea e gota espessa coradas com o método de Mary-Grunwald Giemsa para identificação e quantificação dos parasitos circulantes por microscopia. A parasitemia foi expressa como o número de parasitas/ μ l de sangue, calculado multiplicando o número de

parasitas contados por 500 leucócitos e o número de leucócitos do indivíduo dividindo o produto por 500. Doadores positivos para *P. vivax* e/ou *P. falciparum* no momento da coleta de sangue foram subsequentemente tratados pelo regime quimioterápico recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico foram realizadas análises moleculares pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando iniciadores (Genone Biotechnologies) específicos para gênero (*Plasmodium* sp.) e espécies (*P. falciparum* e *P. vivax*) em todas as amostras, conforme descrito previamente por Snounou *et al.*, 1999 (163).

O DNA foi extraído das amostras de sangue criopreservadas utilizando o kit comercial QIAmp® DNA Blood Mini (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 200 µL de sangue previamente descongelado em temperatura ambiente foram adicionados a um tubo *ependorf* de 1.5 mL com 20 µL de protease K (QIAGEN) no fundo e levemente homogeneizado. Em seguida foram adicionados 200 µL do tampão AL (QIAGEN). O tubo foi homogeneizado rapidamente em vórtex e incubado a 56 °C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados 200 µL de etanol 96-100%, o tubo foi novamente homogeneizado por 15 segundos, e em seguida adicionado no tubo com a coluna. A coluna inserida no tubo foi centrifugada por 3 minutos a 8.000 rpm e a coluna foi removida para um novo tubo desprezando o líquido. Em seguida, foram adicionados 500 µL do tampão AW1 (QIAGEN) seguido de centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm e remoção da coluna para um novo tubo. Então, foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem AW2 (QIAGEN) e o tubo foi centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm. Por fim, a coluna foi removida para outro tubo, onde o DNA foi eluído em 100 µL do tampão AE (QIAGEN) e estocado a 4 °C até a sua utilização.

Para a reação de PCR foram utilizados 2 µL do DNA extraído dos isolados plasmodiais acrescidos a 23 µL do mix de PCR, contendo 2,5 µL de DNTPs a 10 nM, 1 µL de cada iniciador (senso e antissenso) a 10 pMol/µL, 2,5 µL de tampão 10x (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), 3 µL de MgCl₂ a 3 mM e 0,25 µL de AmpliTaq Gold™ DNA Polimerase (Applied Biosystem) 12,75 µL de água destilada ultrapura (Invitrogen) totalizando o volume final de 25 µL por reação. As reações de PCR foram submetidas a ciclagem de temperatura específicas para cada par de

primer no termociclador ProFlex PCR System® (Applied Biosystems) e Veriti 96 Well Cycler (Applied Biosystem), nas condições descritas na tabela 3. Em todas as reações foram utilizados um controle negativo sem DNA, um controle com DNA extraído de isolado de *P. vivax* e um controle positivo (DNA extraído a partir de cultura *in vitro* de *P. falciparum*, cepa W2).

3.6 Proteínas recombinantes de MSPDBL-1 e MSPDBL-2

As proteínas recombinantes correspondentes a região DBL das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram doadas pelo colaborador Dr. Michael Theisen (*Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca*) (Figuras 10 e 11).

<p>Mspdbl-1</p> <p>MKKIYSIFFSLFILNLHIYKNIKCNLDLNYNDSNLRNGLLNSLDLTNGLNKNKNSFID SKIEEHENKSYQNKDNNISIVGQDVPITSVYSSKIINANDLEGNSIDDTKGLSVTNSGFD DGSAFGGGLPFGSGYSPLQGNHNKCPDENFCGKIGKIVLSCPPKNSTGRNGDWISVAVKES TTNKGVLPVPPRRTKLC LRNINKVWHRIKDEKNFKEEFVKVALGESNALMKHYKEKNLAL TAIKYGFSDMGDIKGTDLIDYQITKNINRALDKILRNETSNDKIKKRVDDWEANKSAFW DAFMCGYKVHIGNKPCPEHDNMDRIPQYLRWFREWGTYVCSEYKKNFEDVIKLCNIQQFT NQDDSQLLEISKDKCKEALKHYEEWVNRRRPEWKGQCDKFEKEKSKYEDTKSITAEKYL KEICSECCKYKDLNTFKFKDNVTLKAVIDNKKNQDSLTTLSLSTINSVRSNLD QRGNITTSQGNSHRATVVQVDQTNRLDNVNSVTQRGNNNYNNLERGLGSGALPGTNI TEEKYSLEIKLTSKDEEDIKHNEVREEIEEQQEDIEEEDDEEENEGETKEEDDEEK NETNDTEDTDDTEDIIEENKEKELSNQQQSEKKSISKVDEDSYRILSVSYKDNNEVK NVAESIVKKLFLFNDNNNLETIFKGLTEDMTDLFQK</p>	<p>DBL1</p> <p>KCPDENFCGKIGKIVLSCPPKNSTGRNGDWISVAVKES TTNKGVLPVPPRRTKLC LRNINKVWHRIKDEKNFKEEFV KVALGESNALMKHYKEKNLALTAIKYGFSDMGDIKGT TDLIDYQITKNINRALDKILRNETSNDKIKKRVDDWEAN KSAFWDAFMCGYKVHIGNKPCPEHDNMDRIPQYLRWF REWGTYVCSEYKKNFEDVIKLCNIQQFTNQDDSQLLEI SKKDKCKEALKHYEEWVNRRRPEWKGQCDKFEKEK KYEDTKSITAEKYLKEICSECCKYKDLNTFKFKD</p>
---	--

Figura 10. Sequência de aminoácidos da proteína recombinante MSPDBL-1. Azul: sequência de aminoácidos do domínio DBL-1.

<p>Mspdbl 2</p> <p>MIYILSIVFYIFFLHIDIYVNIYSTCFVFNENGNPNLRNINIINDELKGGKAYNNTIDAN NQNIENKNLKHNVNS SHISKFSDIMDQEDKGDNENSHDIKFEKKNINKSLDAES GINEISITGNDSDNSNQNIIFPDGSELAGGIPRSIYTINLGFNKCPTEEICKDFSNLI CRKNVHERNNWLGSSVKNFSSDNKGVLPVPPRRTKLC LRITLQDFRTKKKKEGDFEK FIYSYASSEARKLRTIHNHNLEKAHQAIRYSFADIGNIIRGDDMMMDTPTSKETITYLEKV LKIYENNDKPKDAKKWWTENRHHVWEAMMCGYQSAQKDNQCTGYGNIDIPQFL RWFREWGTYVCEESEKNMNTLKAVCFPKQPRTEANPALTVENEMCSSTLKKYEE WYNKRKTEWTEQSIKYNNDKINYTDIKLSPSEYLIEKCECKCTKKNLQDVLFELFD GKALLEKLKKEESPVSNVSNALPEPGQITLDPDSLKQTTQENQPVVETPVTTAVINE HQGQTEPNKGDNNNERENHESNVSIGEVNQGSVSEESH SKTIDP SKIDDRLELSSG SSSLEQHSKEDVKKGALELVLPSLDIEQIANESDVLIEIEEINTDGEIYEITEEIK EDIEEETEEDIEEETEETEEETEEADEETVKEIEDKPEQEIKNKSLLEKQIDKNTDTS EKKGFNNSSEKDEKARNLISKYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSK DITNLFKN</p>	<p>DBL2</p> <p>KCPTEEICKDFSNLPQCRKNVHERNNWLGSSVKNFSSDN KGVLPVPPRRTKLC LRITLQDFRTKKKKEGDFEXFIYSASSE ARKLRTHHNHNLEKAHQAIRYSFADIGNIIRGDDMMMDTPT SKETITYLEKVLKIYENNDKPKDAKKWWTENRHHVWEA MIMCGYQSAQKDNQCTGYGNIDIPQFLRWFREWGTYV CEESEKNMNTLKAVCFPKQPRTEANPALTVENEMCSST LKKYEEWYNKRKTEWTEQSIKYNNDKINYTDIKLSPSEYL IEKCECKCTKKNLQDVFEF</p>
--	---

Figura 11. Sequência de aminoácidos da proteína recombinante MSPDBL-2. Laranja: sequência do domínio DBL-2.

3.7 Predição de epítomos lineares/contínuos de célula B

A predição dos epítomos lineares de células B foi realizada em colaboração com o Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva, utilizando o software BCPreds (164). As sequências das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram submetidas à predição de epítomos de células B no programa BCPreds: B-cell epitope prediction. A predição dos epítomos lineares de células B foi realizada em colaboração com o Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva, utilizando o software BCPreds (165). Essa predição é baseada usando modelos de vetores de suporte de máquinas. Uma classe de método de aprendizagem de máquinas supervisionadas utilizadas para classificação e regressão. Foi realizada a seleção de busca por epítomos com 15 aminoácidos e todos acima do limiar padrão estabelecido pelo programa (75%) foram considerados.

3.8 Síntese dos peptídeos

Após uma análise consensual das ferramentas de predição *in silico*, três sequências foram identificadas como epítomos relevantes dentro da sequência de MSPDBL-1 e 6 sequências foram identificadas como epítomos relevantes dentro da sequência de MSPDBL-2. Dessa forma, as sequências foram sintetizadas por fluorenilmetoxicarbonil (F-moc) química de fase sólida (164,165,166) (*GenOne Biotechnologies*, Brasil). A cromatografia analítica dos peptídeos demonstrou uma pureza de > 95% e a análise espectrométrica de massa também indicou as massas estimadas para cada um deles, conforme tabela abaixo:

Tabela 2. Peptídeos sintetizados correspondentes aos epítomos B preditos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2

Proteína	Peptídeo	Estrutura	Massa estimada (g/mol)
MSPDBL1 (143-443)	P1	AK-20	2168.49
	P2	GT-20	2364.58
	P3	KS-20	2173.41
MSPDBL 2 (161-457)	P4	QY-20	2557.85
	P5	EN-20	2646.81
	P6	SS-20	2339.54
	P7	TK-20	2300.71
	P8	MD-20	2196.35
	P9	KH-20	2207.55

3.9 Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 e peptídeos

Para a avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram utilizadas proteínas recombinantes correspondentes às regiões DBL-1 e DBL-2 de MSPDBL-1 e MSPDBL-2, doadas pelo colaborador Doutor Michael Theisen do Statens Serum Institut (Copenhague, Dinamarca). Aqui foram pesquisados os anticorpos IgG e IgM pela técnica de ELISA, em condições previamente padronizadas. As subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram avaliadas em todas as amostras que apresentaram anticorpos IgG para estes antígenos estudados. E para avaliação da resposta imune humoral contra os peptídeos para a pesquisa do mapeamento dos epítomos foram realizadas em todas as amostras para que fossem pesquisadas a reação para anticorpos IgG.

Placas de 96 poços da marca *Nunc Maxisorp* foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes e os peptídeos. Para as proteínas, as placas foram sensibilizadas com Carbonato/Bicarbonato e para os peptídeos sintéticos foram sensibilizadas com PBS 1x, ambas overnights. No dia seguinte, as placas eram lavadas 3 vezes com PBS 1x- Tween20 a 0,05% e feito o bloqueio com 2% de BSA em PBS 1x- Tween20 0,05% por hora a 37 °C. Após o período de incubação de cada

etapa a placa é lavada sempre 3x com PBS 1x- Tween 20 0,05%. Na etapa seguinte, o soro era diluído 1:100 em 0,5% de BSA em PBS 1x-Tween 20 0,05% e incubado por 1 hora a 37°C. Na etapa seguinte, após a lavagem, o anticorpo IgG era diluído 4µL/1000 mL (para as proteínas) e 1µL/2000 mL (peptídeos sintéticos) em 0,5% de BSA em PBS 1x-Tween 20 0,05% por mais uma hora. Após nova lavagem, ao término da incubação, a reação foi revelada com 100 µL de uma solução contendo 0,4 mg/mL de OPD (*Sigma*) em tampão de citrato-fosfato pH 5,4 (ácido cítrico 24 mM, *Sigma*, e fosfato de sódio dibásico, 51 mM, *Sigma*) e peróxido de hidrogênio 30%, da *Merck*, diluído 1:2000 durante aproximadamente 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2N (*Merck*).

A leitura da placa foi feita por meio da leitura da Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro *Spectramax* (*Molecular Devices, Califórnia, EUA*) a 492nm. Todos os plasmas foram testados em duplicata e cada placa recebeu um controle “branco” (sem plasma), dois soros-padrão reativos e cinco soros-padrão não reativos, sendo estes últimos de indivíduos que não residem em área endêmica e nunca tiveram malária. Estes resultados foram analisados pelo limite mínimo de positividade (*cut off*), que foi calculado a partir da média da DO dos controles negativos mais três vezes o Desvio Padrão (DP). A positividade foi determinada pela razão (Índice de Reatividade) entre a DO das amostras testadas e o *cut off*. As amostras com resultados superiores a 1.0 foram consideradas positivas.

3.10 Análise dos dados epidemiológicos e estatísticos

Os dados epidemiológicos e os resultados dos experimentos foram armazenados no banco de dados Epi-Info 6 (*Centers for Disease Control and Prevention*) e analisados utilizando os programas Epi-Info e GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc). Os testes estatísticos utilizados para verificar as associações e correlações entre os resultados experimentais e os dados epidemiológicos foram selecionados a partir do tipo e tamanho das amostras de cada variável. Considerou-se que a diferença era significativa quando a probabilidade de erro era igual ou inferior a 5% ($P \leq 0.05$).

Teste de Spearman

Spearman é um método estatístico não-paramétrico de associação entre duas variáveis mensuradas a nível ordinal, onde a correlação é calculada pelo coeficiente de *Spearman* (r_s). Esse foi o método estatístico utilizado na avaliação da correlação entre variáveis estudadas, utilizado em nosso trabalho para verificar as associações entre dados epidemiológicos numéricos, como por exemplo, tempo de residência em área endêmica e dados de resposta imune humoral.

Teste do Qui-quadrado

O teste do qui-quadrado é um método estatístico para n amostras independentes, cujas proporções observadas nas diversas modalidades estão dispostas em tabelas de contingência 2×2 , sendo os valores esperados deduzidos matematicamente, e onde se procura determinar se as proporções observadas nas diferentes categorias são independentes ou estão associadas. Esse foi o teste utilizado para a avaliação das frequências entre as variáveis analisadas como, por exemplo, o número de respondedores e não respondedores em cada um dos grupos estudados.

Teste de Mann Whitney

O teste não-paramétrico de Mann Whitney compara as médias de dois grupos não-pareados. Esse foi o teste escolhido para a avaliação estatística das diferenças existentes entre duas variáveis estudadas de indivíduos diferentes, como por exemplo, diferenças entre médias dos níveis de anticorpos (Ratio) entre indivíduos parasitados e não parasitados.

Teste de Wilcoxon

O teste não-paramétrico de *Wilcoxon* compara as médias de dois grupos pareados. Esse foi o teste escolhido para a avaliação estatística das diferenças existentes, por exemplo, nos níveis de anticorpos (Índice de Reatividade) antes (Dia 0) e 15 dias após o início do tratamento (Dia 15).

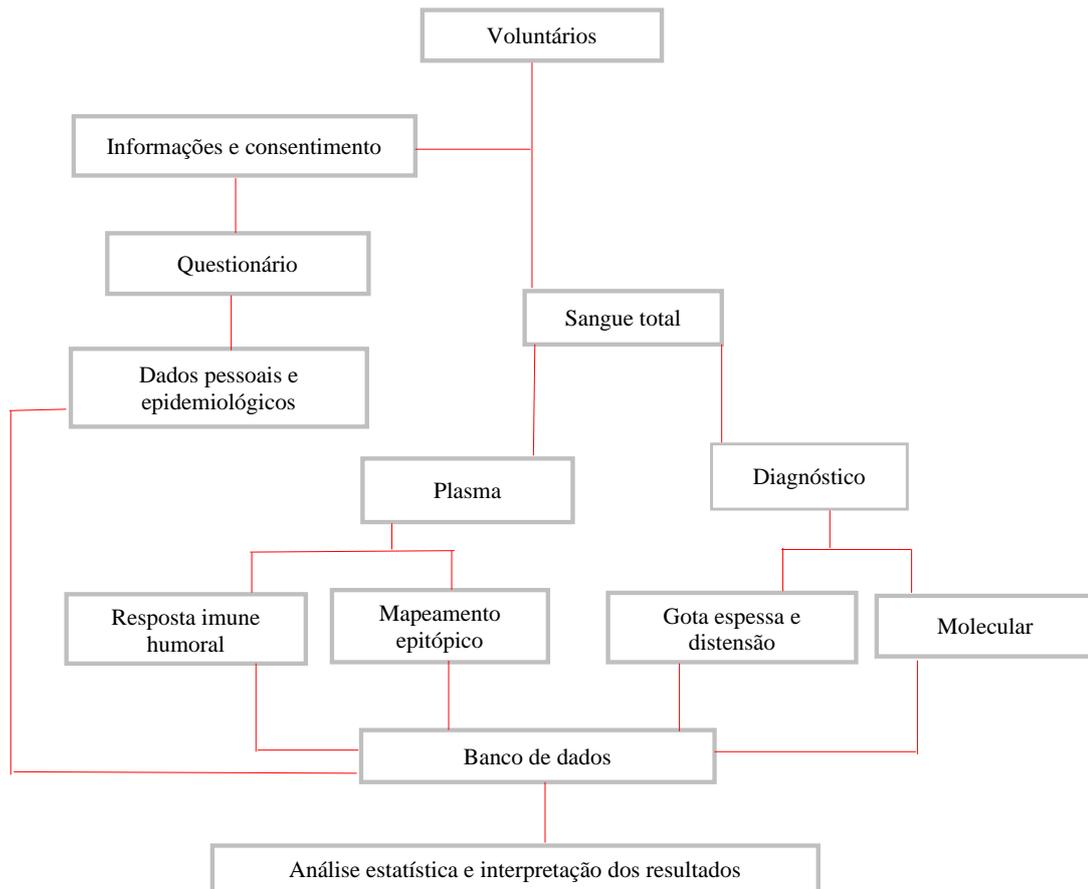


Figura 12. Resumo esquemático da metodologia.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos do estudo

Para a avaliação do perfil da resposta anticorpo contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2, foram utilizadas amostras de 299 indivíduos: 124 indivíduos residentes em Cruzeiro do Sul (Grupo CZS), de 88 indivíduos residentes em Mâncio Lima (Grupo ML) e de 87 indivíduos residentes em Guajará (Grupo GJ). Também foram utilizadas as amostras de 53 indivíduos residentes em áreas endêmicas sem histórico de malária que foram utilizadas como controles de área (grupo CO).

As principais características dos grupos CZS, ML, GJ e CO estão apresentadas nas Figuras 13 e 14 e na Tabela 3. Os dados da história pessoal e epidemiológica de todos os pacientes correspondem aos do início do estudo.

O grupo CZS consistia em 58 (46,7%) indivíduos do sexo feminino e 66 (53,3%) do sexo masculino (Tabela 3), com idades variando entre 12 e 73 anos (33 ± 15). A grande maioria desses indivíduos (98,2%) era proveniente da região amazônica (Figura 13) e estava residindo em área endêmica, em média, há 33 anos (33 ± 15). No momento da coleta, 72 indivíduos (58%) apresentavam sintomas iniciados, em média 4 dias antes da coleta (4 ± 4), sendo cefaleia, febre e calafrio os mais frequentes, relatados por 74%, 68% e 48% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 64 indivíduos (51,6%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 25 (20,2%) estavam infectados com *P. falciparum* e 39 (31,4%) estavam infectados com *P. vivax*, com média de parasitemia de 16000 ± 20092 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 19142 ± 17599 para parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax* (Tabela 3). Os indivíduos do grupo CZS relataram uma média de 10 episódios de malária (10 ± 13) (Tabela 3), sendo que, dos indivíduos que relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença (99,2%), 67% relataram infecção prévia por *P. falciparum* e *P. vivax*, 23% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax*, 10% apenas por *P. falciparum*. Os indivíduos do grupo CZS relataram o último episódio de malária há 60 meses (60 ± 97), sendo *P. falciparum* a

última espécie plasmodial infectante em 35% dos casos, *P. vivax* em 61% dos casos e infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*) em 4% dos casos (Tabela 3 e Figura 14).

O grupo ML consistia em 44 (50%) indivíduos do sexo feminino e 44 (50%) do sexo masculino (Tabela 3), com idades variando entre 13 e 88 anos (35 ± 16). Todos os indivíduos eram provenientes da região amazônica (Figura 13) e estavam residindo em área endêmica, em média, há 35 anos (35 ± 16). No momento da coleta, 48 indivíduos (55%) apresentavam sintomas iniciados, em média, 6 dias antes da coleta (6 ± 14), sendo cefaleia, febre e calafrio os mais frequentes, relatados por 75%, 92% e 57% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 37 indivíduos (42%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 12 (13,6%) estavam infectados com *P. falciparum* e 25 (28,4%) estavam infectados com *P. vivax*, com média de parasitemia de 5600 ± 3577 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 23294 ± 15507 parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax* (Tabela 3). Os indivíduos do grupo ML relataram uma média de 13 episódios prévios de malária (13 ± 13) (Tabela 3). Todos os indivíduos relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença, sendo que 19% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax* e 81% relataram infecção prévia por *P. vivax* e por *P. falciparum*. Os indivíduos do grupo ML relataram o último episódio de malária há 28 meses (28 ± 45), sendo *P. falciparum* a última espécie plasmodial infectante em 17% dos casos e *P. vivax* em 83% dos casos (Tabela 3 e Figura 14).

O grupo GJ consistia em 42 (48,3%) indivíduos do sexo feminino e 45 (51,7%) do sexo masculino (Tabela 3), com idades variando entre 13 e 83 anos (37 ± 17). Todos os indivíduos eram provenientes da região amazônica (Figura 13) e estavam residindo em área endêmica, em média, há 35 anos (37 ± 17). No momento da coleta, 21 indivíduos (24,1%) apresentavam sintomas iniciados, em média, 8 dias antes da coleta (8 ± 8), sendo cefaleia, febre e artralgia os mais frequentes, relatados por 86%, 62% e 48% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 17 indivíduos (19,5%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 6 (6,7%) estavam infectados com *P. falciparum* e 11 (12,8%) estavam infectados com *P. vivax*, com média de parasitemia de 8000 ± 5656 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 10666 ± 8326 parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax* (Tabela 3). Os indivíduos do grupo GJ relataram uma média de 9 episódios de malária (9 ± 10)

(Tabela 3), sendo que, dos indivíduos que relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença (93%), 70% relataram infecção prévia por *P. falciparum* e *P. vivax*, 22% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax*, 8% apenas por *P. falciparum*. Os indivíduos do grupo GJ relataram o último episódio de malária há 48 meses (48 ± 73), sendo *P. falciparum* a última espécie plasmodial infectante em 28% dos casos e *P. vivax* em 70% dos casos e infecção *P. falciparum* e *P. vivax* em 2% dos casos (Tabela 3 e Figura 14).

O grupo CO (controle de área) consistia em 37 (69,8%) indivíduos do sexo feminino e 16 (30,2%) do sexo masculino, com idades variando entre 17 e 43 anos (23 ± 7). A grande maioria desses indivíduos (96,2%) era proveniente da região amazônica (Figura 13) e estava residindo em área endêmica, em média, há 22 anos (22 ± 8). Todos os indivíduos declararam nunca ter sido infectado e nenhum apresentava sintomatologia ou parasitos circulantes no momento da coleta.

O grupo CO apresentou uma maior frequência de indivíduos do sexo feminino que os grupos CZS ($P = 0.008$), ML ($P = 0.03$) e GJ ($P = 0.02$) (Tabela 3). Os indivíduos do grupo CO apresentaram uma média de idade e de tempo de residência em área endêmica de malária menor que os grupos CZS, ML e GJ ($P < 0.0001$, para todas as análises). O grupo ML apresentou um maior número de infecções anteriores de malária que os grupos CZS ($P = 0.01$) e GJ ($P = 0.0008$). O grupo GJ apresentou um maior tempo de início de sintomas que os grupos CZS e ML ($P = 0.003$, para ambos).

Tabela 3. Principais características dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima) e GJ (Guajará)

		Cruzeiro do Sul <i>n</i> = 124	Mâncio Lima <i>n</i> = 88	Guajará <i>n</i> = 87	Total
Idade (anos)		33 ± 15	35 ± 16	37 ± 17	32 ± 16
Sexo	Feminino	58 (46,7%)	44 (50%)	42 (48,3%)	144 (48%)
	Masculino	66 (53,3%)	44 (50%)	45 (51,7%)	155 (52%)
Sintomas	Cefaleia	74%	75%	86%	
	Febre	68%	92%	62%	
	Calafrio	48%	57%	7%	
	Artralgia	26%	27%	48%	
Tempo de residência em área endêmica (anos)	33 ± 15	35 ± 16	37 ± 17	32 ± 165	
Número de infecções anteriores de malária	10 ± 13	13 ± 13*	9 ± 10	8 ± 12	
Tempo da última infecção (meses)	60 ± 97	28 ± 45	48 ± 73	12 ± 78	
Tempo de início dos sintomas (dias)	4 ± 4	6 ± 14	8 ± 8 **	4 ± 9	
Diagnóstico	<i>P. falciparum</i>	25 (20,2%)	12 (13,6%)	6 (6,7%)	43 (14,4%)
	<i>P. vivax</i>	39 (31,4%)	25 (28,4%)	11 (12,8%)	75 (25,1%)
Parasitemia (parasitos/microlitro de sangue)	<i>P. falciparum</i>	16000 ± 20092	5600 ± 3577	8000 ± 5656	12761 ± 16999
	<i>P. vivax</i>	19142 ± 17559	23294 ± 15507	10666 ± 8326	20083 ± 16512

**** P = 0.01 ML versus CZS, P = 0.0008 ML versus GJ; * P = 0.003 GJ versus CZS, P = 0.003 GL versus ML. N: Número de indivíduos testados.**

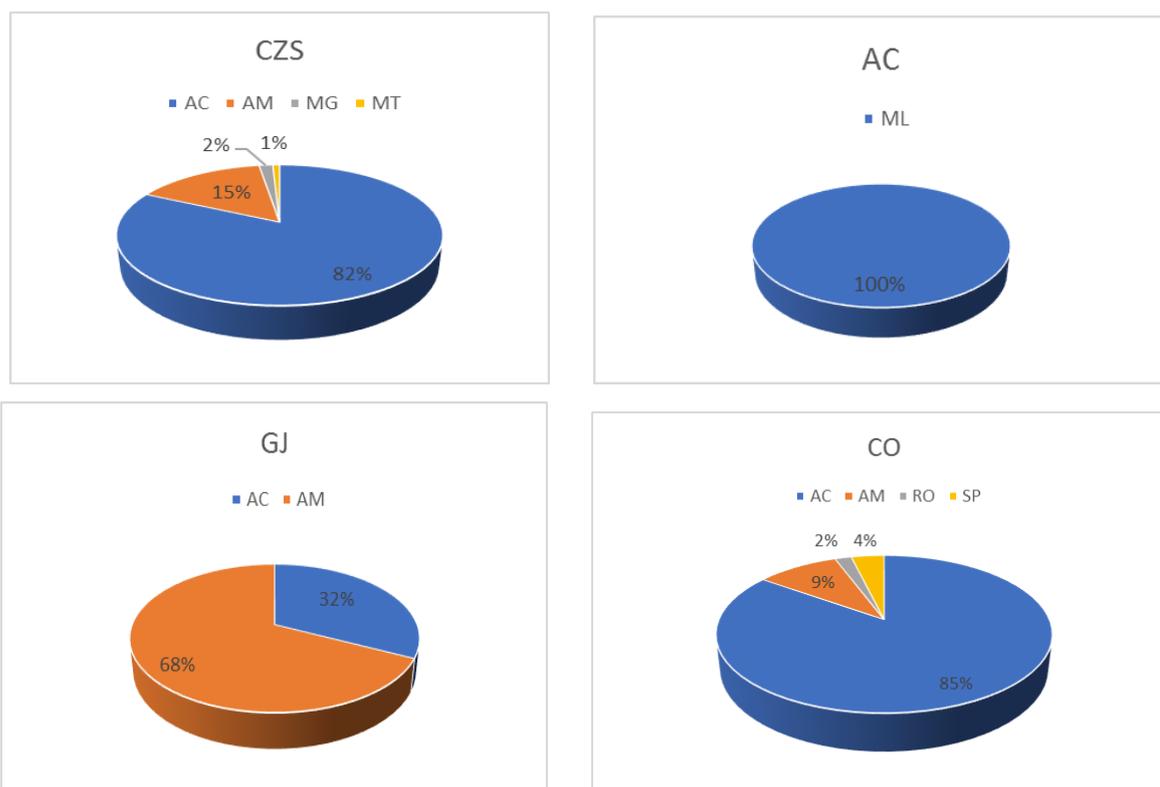
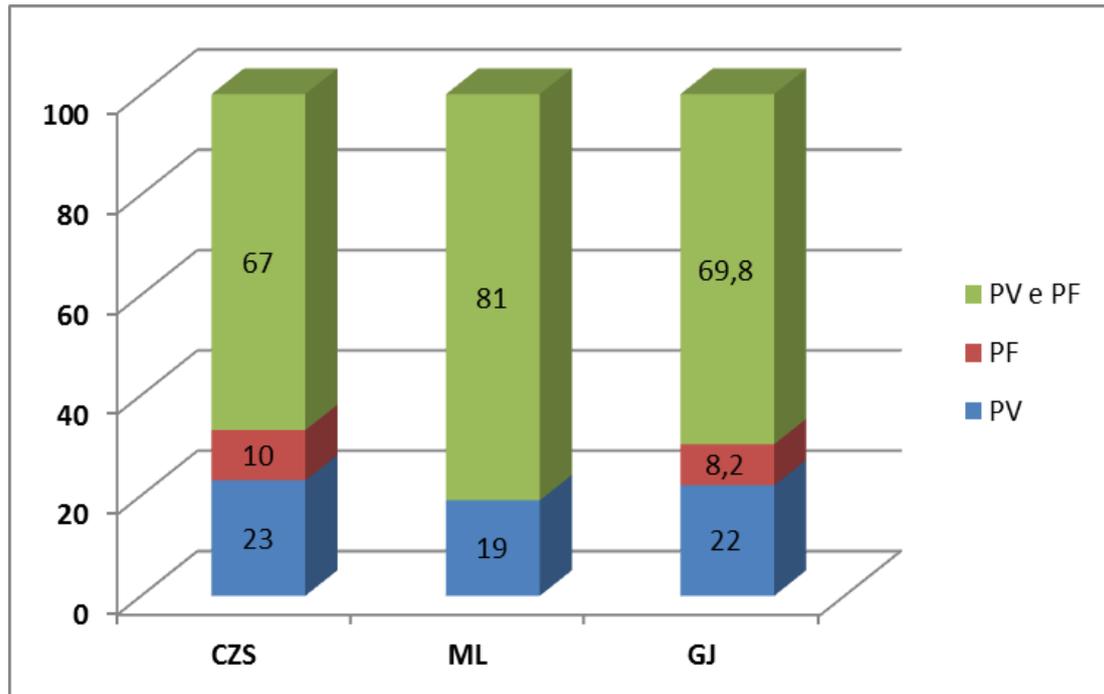


Figura 13. Procedência dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima), GJ (Guajará) e CO (Grupo Controle). AC: Acre; AM: Amazonas; MT: Mato Grosso; MG: Minas Gerais; RO: Rondônia; SP: São Paulo

A



B

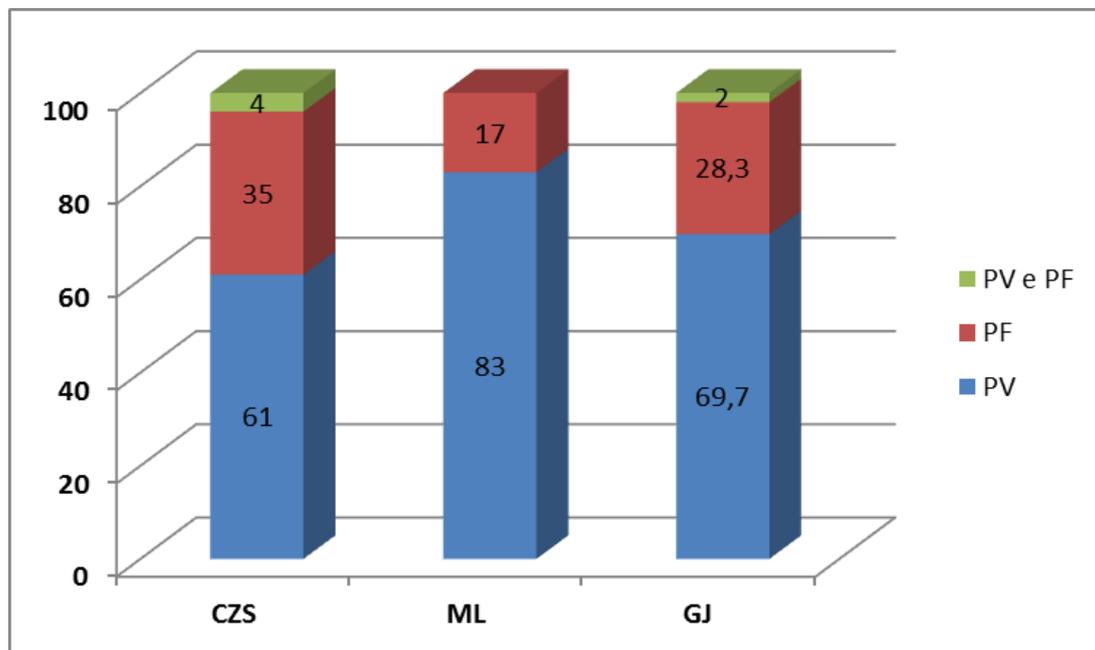


Figura 14. Frequência de espécies plasmodiais de episódios prévios de malária (A) e última espécie plasmodial infectante (B). CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará; PF: *P. falciparum*; PV: *P. vivax*; PV e PF: *P. vivax* e *P. falciparum*.

4.2 Avaliação da resposta imune contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2

A resposta imune contra a região DBL das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foi avaliada em 299 indivíduos residentes em Cruzeiro do Sul (AC), Mâncio Lima (AC) e Guajará (AM). Independente da classe de anticorpo, verificamos que a MSPDBL-1 foi reconhecida por anticorpos presentes nas amostras de 176 dos 299 indivíduos (59%) enquanto a MSPDBL-2 foi reconhecida por anticorpos presentes nas amostras de 160 dos 299 indivíduos (54%).

As prevalências da resposta anticorpo das classes IgG e IgM contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão mostradas na Figura 15. As prevalências de indivíduos com anticorpos IgG e IgM foram semelhantes, respectivamente, 42,2% e 28,8% para MSPDBL-1 e 42,5% e 28,8% para MSPDBL-2.

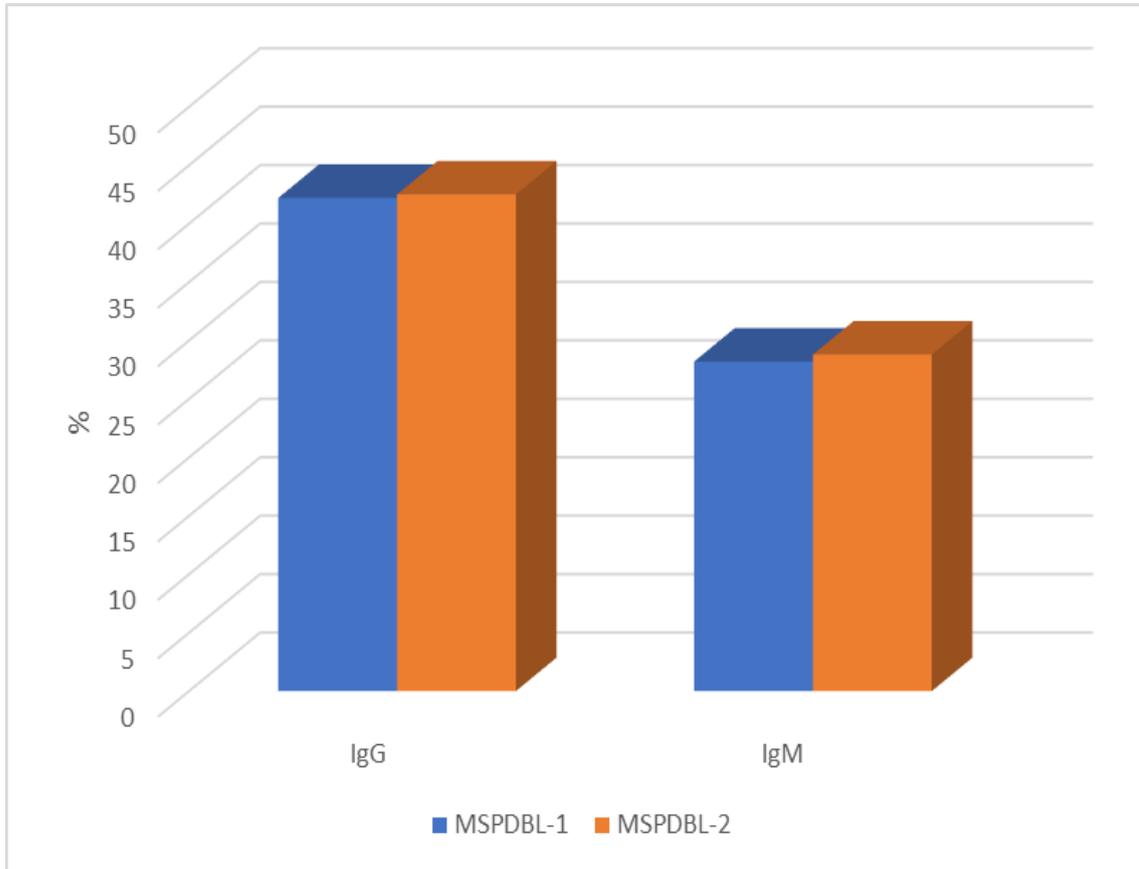


Figura 15. Prevalências da resposta anticorpo das classes IgG e IgM contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.

Os índices de reatividade dos anticorpos IgG e IgM que reconhecem a proteína MSPDBL-1 foram similares aos índices de reatividade dos anticorpos IgG e IgM que reconhecem a proteína MSPDBL-2. Entretanto, verificamos que os índices de reatividade dos anticorpos IgG anti-MSPDBL-1 foram maiores que os índices de reatividade dos anticorpos IgM anti-MSPDBL-1, da mesma forma que os índices de reatividade dos anticorpos IgG anti-MSPDBL-1 foram maiores que os índices de reatividade dos anticorpos IgM anti-MSPDBL-2 (MSPDBL-1: $P < 0.0001$; MSPDBL-2: $P = 0.007$) (Figura 16). Também verificamos que os índices de reatividade dos anticorpos IgG e IgM anti-MSPDBL-1 e anti-MSPDBL-2 estavam positivamente correlacionados (IgG: $P < 0.0001$, $r = 0.3984$; IgM: $P < 0.0001$, $r = 0.5256$) (Figura 17).

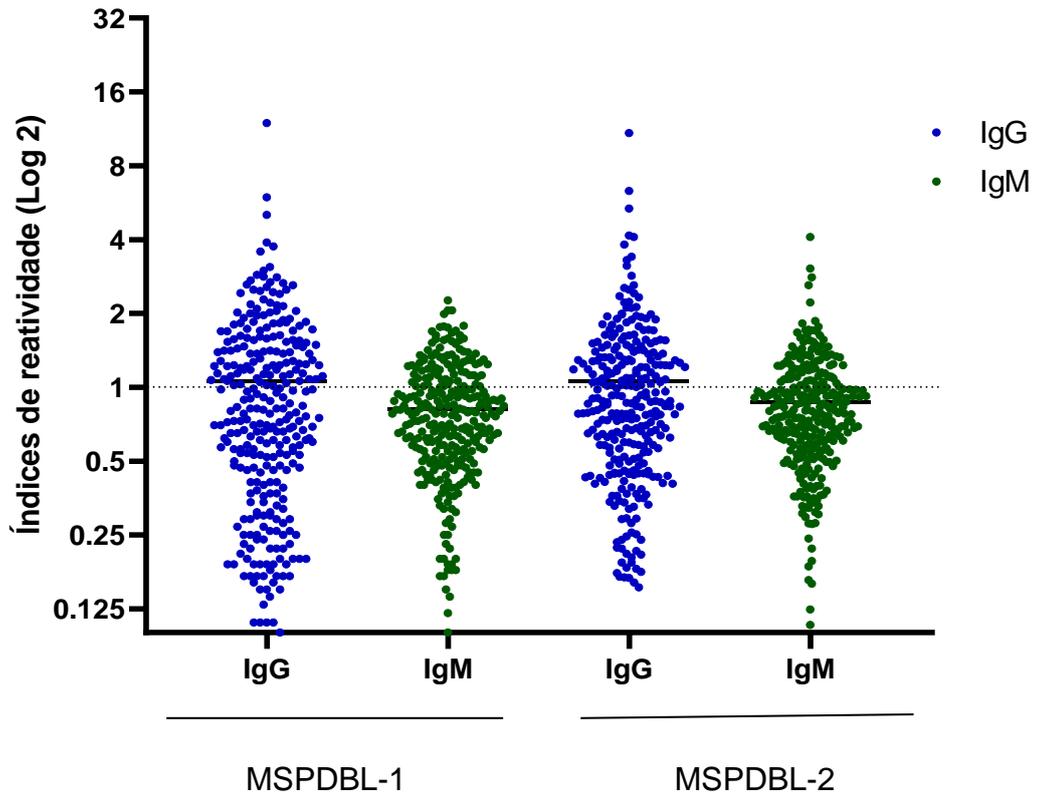


Figura 16. Índices de reatividade dos anticorpos IgG e IgM para as proteínas recombinantes MSPDBL-1 e a MSPDBL-2 nos indivíduos estudados. Linhas sólidas indicam a média. Linha pontilhada indica o limite da positividade.

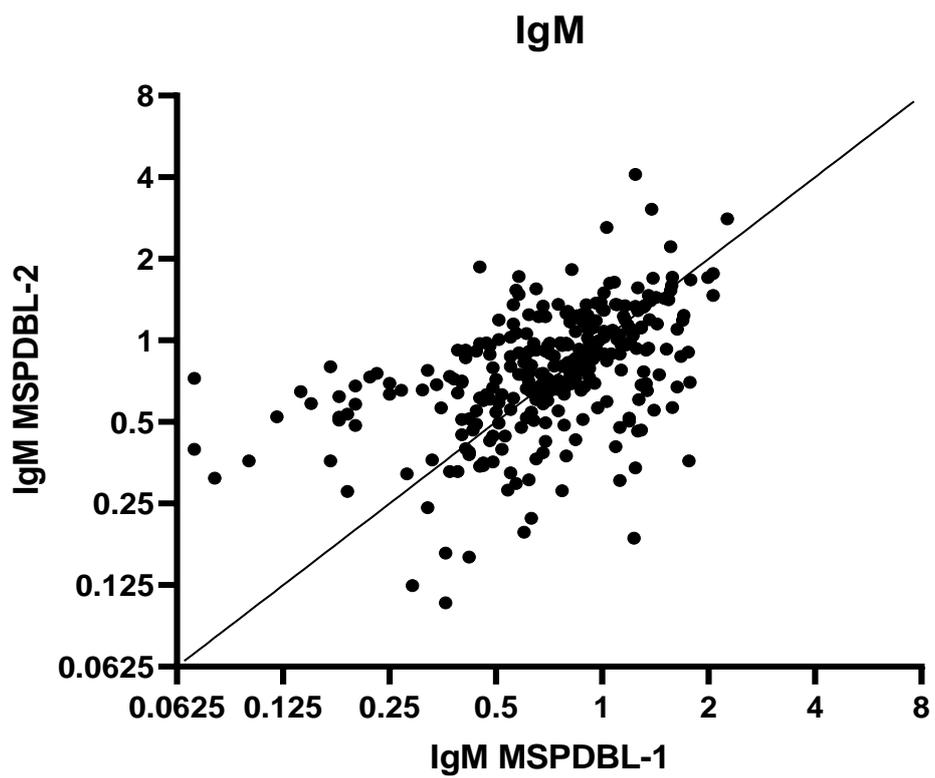
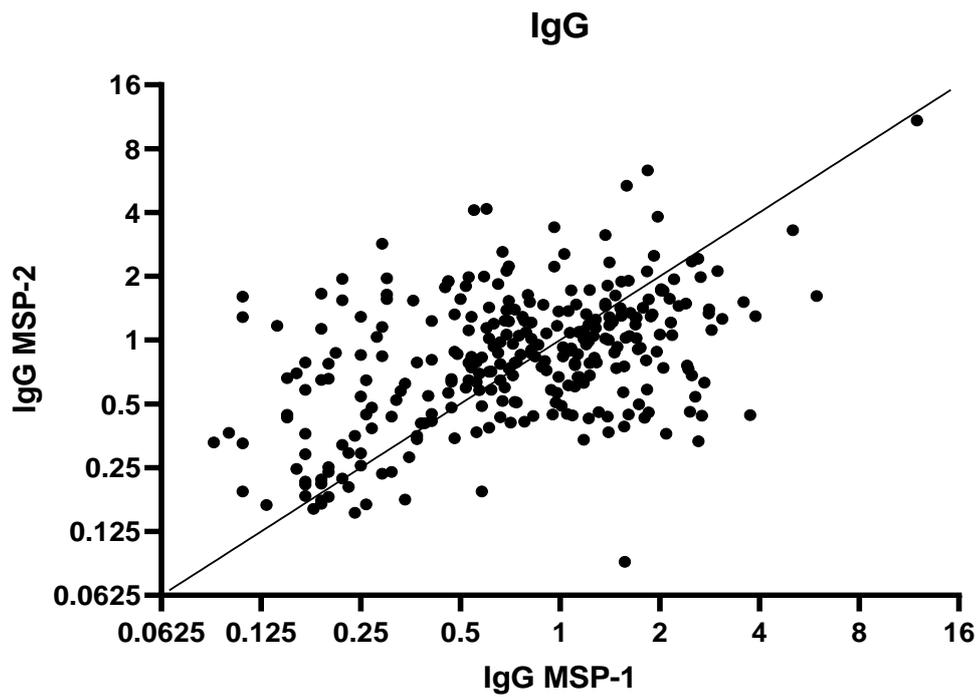


Figura 17. Correlação entre IgG ou IgM contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.

A Figura 18 mostra a prevalência de indivíduos com anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 nos indivíduos estudados. As prevalências de indivíduos com anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram 47,6%, 8,7%, 31,7% e 9,5% para MSPDBL-1 e 44,1%, 13,4%, 35,4% e 25,2% para MSPDBL-2. Para MSPDBL-1, a prevalência de indivíduos com anticorpos IgG1 e IgG3 foi maior que com anticorpos IgG2 e IgG4 ($P < 0.0001$, para todas as análises). Para MSPDBL2, a prevalência de indivíduos com anticorpos IgG1 foi maior que a prevalência de indivíduos com anticorpos IgG2 e IgG4 ($P < 0.0001$, IgG1 *versus* IgG2; $P = 0.002$, IgG1 *versus* IgG4) e a prevalência de indivíduos com anticorpos IgG3 foi maior que a prevalência de indivíduos com anticorpos IgG2 ($P < 0.0001$). A prevalência de indivíduos com anticorpos IgG4 anti-MSPDBL2 foi maior que a prevalência de indivíduos com anticorpos IgG4 anti-MSPDBL-1 ($P = 0.001$).

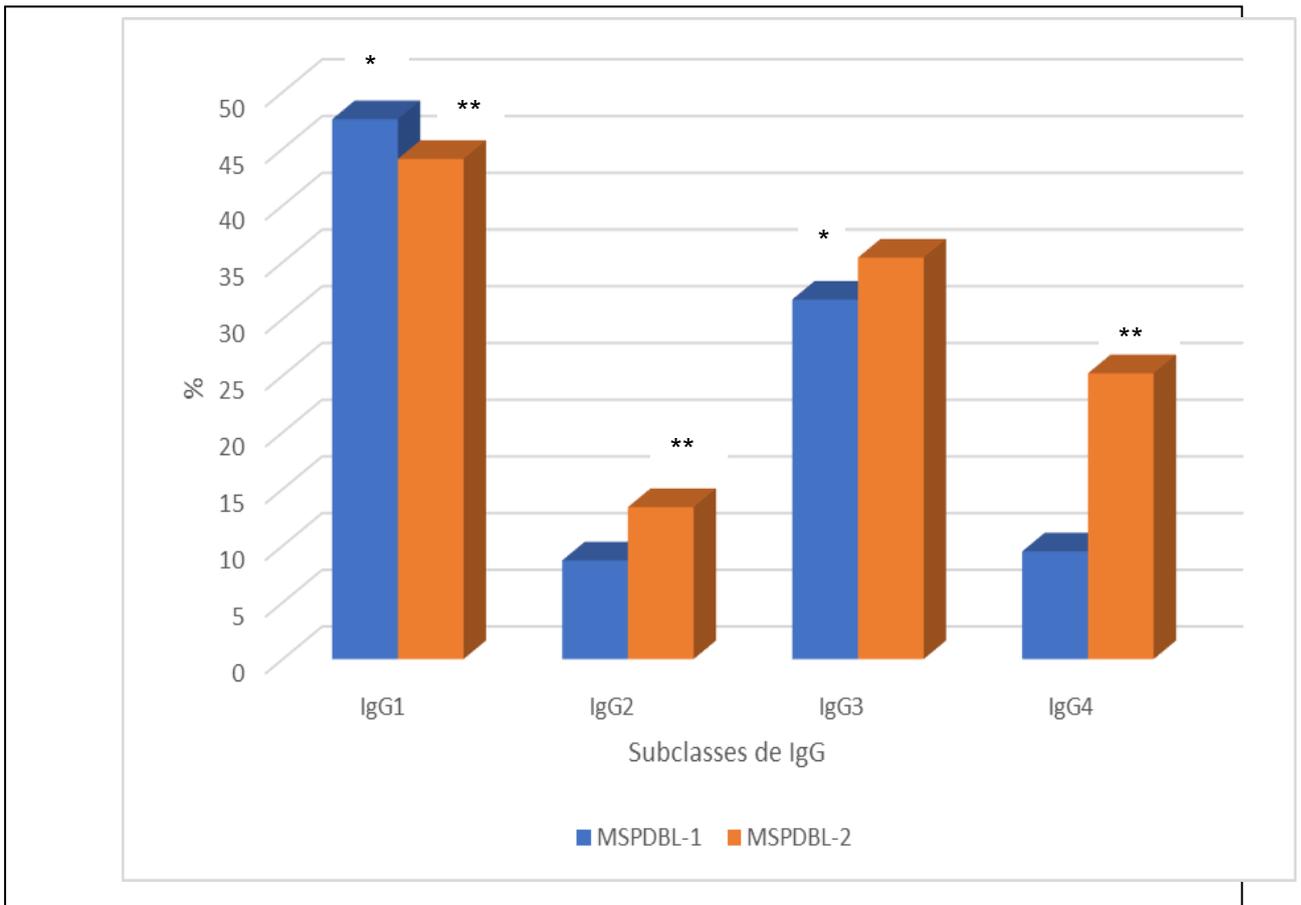


Figura 18. Prevalência de indivíduos com IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2. * P < 0.0001, IgG1 e IgG3 versus IgG2 e IgG4. ** P < 0.0001 IgG1 versus IgG2 e IgG4; P = 0.002 IgG1 versus IgG4.

Nossos dados também mostraram que os índices de reatividade dos anticorpos IgG1 contra a MSPDBL-1 foram maiores que os índices de reatividade dos anticorpos IgG2, IgG3 e IgG4 anti-MSPDBL-1 ($P < 0.0001$, para todas as análises) enquanto os índices de reatividade dos anticorpos IgG1 e IgG3 anti-MSPDBL-2 foram maiores que os índices de reatividade dos anticorpos IgG2 e IgG4 anti-MSPDBL-2 ($P < 0.0001$ IgG1 *versus* IgG2 e IgG4; $P = 0.0001$ IgG3 *versus* IgG2; $P = 0.03$ IgG3 *versus* IgG4) (Figura 19).

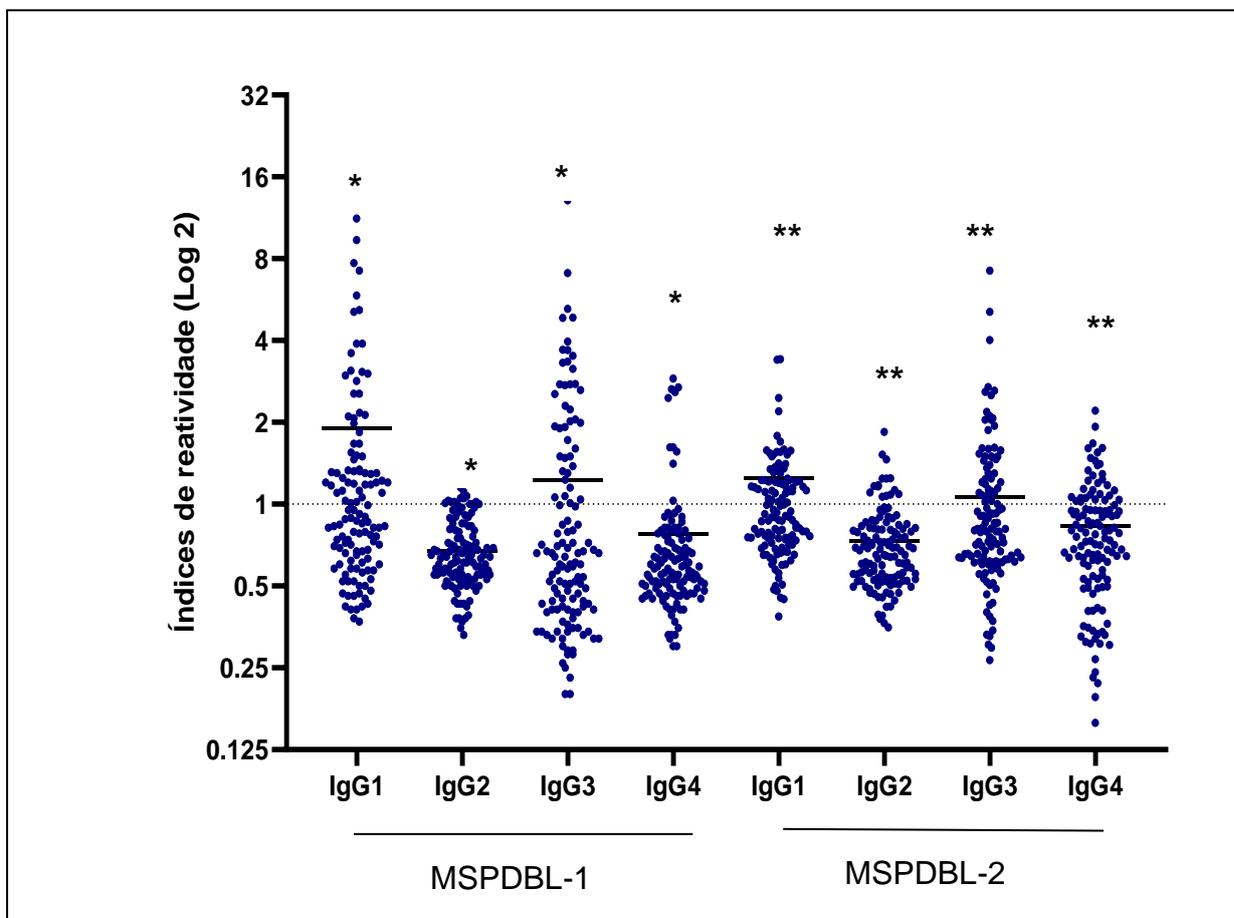


Figura 19. Índices de reatividade de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos para as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2. Linhas sólidas indicam a média. Linha pontilhada indica limite de positividade. * $P < 0.0001$ IgG1 versus IgG2, IgG3 e IgG4. ** $P < 0.0001$ IgG1 versus IgG2 e IgG4; $P = 0.0001$ IgG3 versus IgG2; $P = 0.03$ IgG3 versus IgG4.

4.3 Avaliação da resposta anticorpo contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em função dos dados pessoais e epidemiológicos

As principais características dos indivíduos respondedores e não respondedores para as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão apresentadas na Tabela 4. Não observamos quaisquer associações entre a resposta anticorpo para as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 e idade, sexo, tempo de residência em área endêmica de malária, número de infecções anteriores de malária, sintomas, a presença ou a ausência de parasitas no sangue ou a parasitemia, espécie infectante ou última espécie plasmodial infectante ($P > 0.05$, para todos). Entretanto, observamos que os indivíduos respondedores para MSPDBL-1 apresentavam maior tempo desde a última infecção que os indivíduos não respondedores ($P = 0.02$). Também observamos uma correlação negativa entre os índices de reatividade dos anticorpos IgG2 contra a MSPDBL-2 e o número de infecções anteriores de malária ($P = 0.005$; $r = - 0.2548$) e entre os índices de reatividade dos anticorpos IgG1 e IgG2 contra a MSPDBL-2 e o tempo da última infecção (IgG1: $P = 0.007$; $r = 0.2749$. IgG2: $P = 0.02$; $r = 0.2273$).

Entretanto, quando separamos os indivíduos por grupos de indivíduos não infectados, indivíduos parasitados com *P. vivax* e indivíduos parasitados por *P. falciparum*, observamos maiores índices de reatividade dos anticorpos IgG e IgG1 contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 nos indivíduos infectados por *P. falciparum* (Figura 20) (MSPDBL1: $P = 0.03$, IgG não infectados versus IgG *P. falciparum*; $P = 0.002$, IgG *P. vivax* versus *P. falciparum*; $P = 0.001$, IgG1 não infectado versus IgG1 *P. falciparum*; $P = 0.02$, IgG1 *P. vivax* versus IgG1 *P. falciparum*. MSPDBL-2: $P < 0.0001$, IgG não infectados versus IgG *P. falciparum*; $P < 0.0001$, *P. vivax* versus *P. falciparum*; $P = 0.0002$, IgG1 não infectado versus IgG1 *P. falciparum*; $P = 0.003$, IgG1 *P. vivax* versus IgG1 *P. falciparum*).

Tabela 4. Características pessoais, clínicas e epidemiológicas apresentadas pelos respondedores e não respondedores para as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.

		MSPDBL-1		MSPDBL-2	
		Respondedor	Não respondedor	Respondedor	Não respondedor
		nº 176 (59%)	nº 123 (41%)	nº 160 (54%)	nº 139 (46%)
Idade		35±17	35±15	34±15	36±16
Sexo	Feminino	83 (28%)	60 (20%)	85 (28%)	58 (19%)
	Masculino	91 (30%)	63 (21%)	73 (24%)	81 (27%)
Tempo de residência em área endêmica de malária		35±17	35±15	34±15	35±16
Sintomas	Sim	72 (24%)	57 (19%)	68 (23%)	61 (20%)
	Não	97 (32%)	63 (21%)	84 (28%)	76 (25%)
Espécie Infectante	<i>P. falciparum</i>	21 (7%)	4 (1%)	21 (7%)	5 (2%)
	<i>P. vivax</i>	30 (10%)	27 (9%)	34 (11%)	23 (7%)
	Não Infectado	124 (41%)	91 (30%)	104 (35%)	111 (37%)
Nº de Infecções anteriores		11±13	11±12	10±12	11±13
Tempo desde a última infecção		60±92*	34±52	49±87	49±69

Idade e tempo de residência em área endêmica de malária: em anos. Tempo desde a última infecção: em meses. Idade, tempo de residência em área endêmica de malária, número de infecções anteriores e tempo desde a última infecção: média ± desvio padrão.

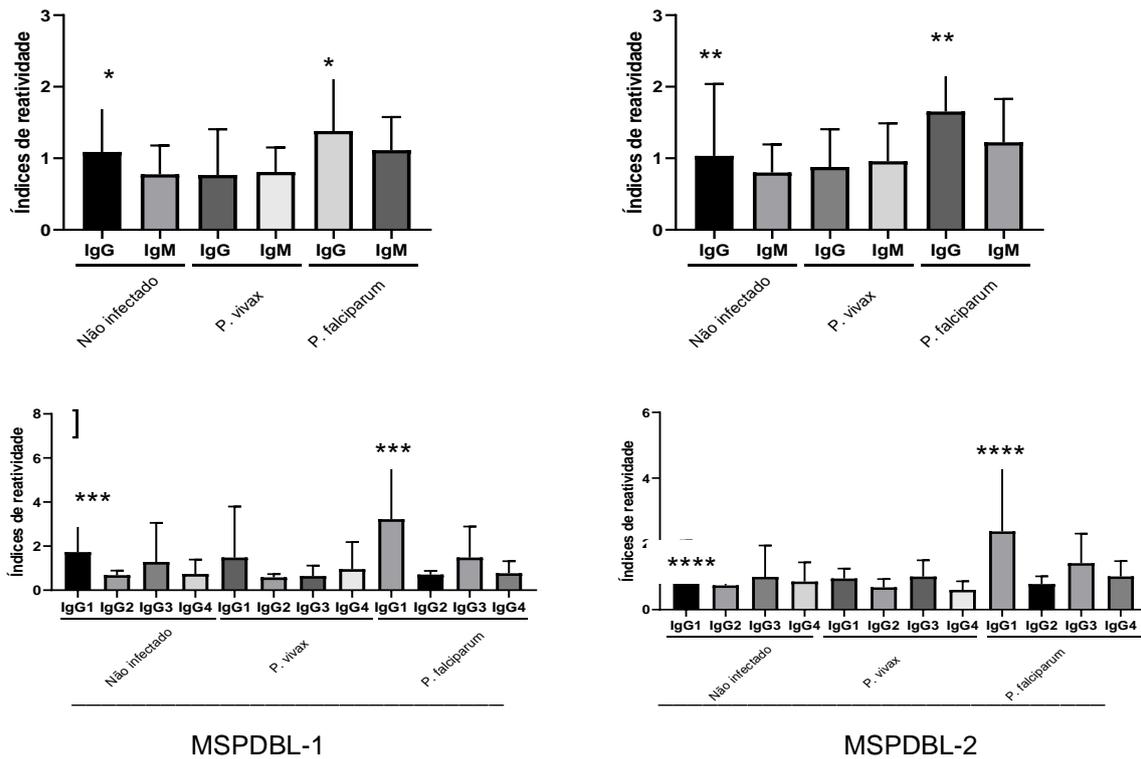


Figura 20. Índices de reatividade de anticorpos contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em indivíduos não infectados, infectados por *P. vivax* ou por *P. falciparum*. * $P = 0.03$, IgG não infectados versus IgG *P. falciparum*; $P = 0.002$, IgG *P. vivax* versus *P. falciparum*; ** $P < 0.0001$, IgG não infectado versus IgG *P. falciparum*; $P < 0.0001$, *P. vivax* versus *P. falciparum*; *** $P = 0.001$ IgG1 não infectado versus IgG1 *P. falciparum*; $P = 0.02$, IgG1 *P. vivax* versus IgG1 *P. falciparum*; **** $P = 0.0002$, IgG1 não infectado versus IgG1 *P. falciparum*; $P = 0.003$, IgG1 *P. vivax* versus IgG1 *P. falciparum*.

4.4 Predição de epítomos B lineares de MSPDBL-1 e MSPDBL-2

As sequências completas das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram analisadas utilizando o software BCPreds. Com base nos algoritmos presentes no *Immuno Epitope Database* (IEDB) e BepiPred para a predição de: 1) polaridade e hidrofobicidade (DNASTAR); 2) exposição na superfície (Surface accessibility scale) e; 3) propensão antigênica de potenciais epítomos lineares presentes nestas proteínas (Bepipred), foram identificadas 3 epítomos presentes na região DBL da MSPDBL-1 e 5 epítomos presentes na região DBL da MSPDBL-2 (Tabela 5; Figuras 21 e 22).

Tabela 5. Epítomos de célula B identificados na região DBL das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2

Proteína	aa Inicial	aa Final	Sequência
MSPDBL-1 (143-443)	175	194	AVKESSTTNKGVLPVPPRRTK
	396	415	GQCDKFEKEKSKYEDTKSIT
	154	173	KNVLSCPPKNSTGRNGDWIS
MSPDBL-2 (161-457)	218	237	QDFRTKKKKEGDFEKFIYSY
	401	420	EEWYNKRKTEWTEQSIKYNN
	172	191	SNLPQCRKNVHERNNWLGSS
	430	449	TLSPSEYLIEKCPECKCTKK
	322	341	MCGYQSAQKDNQCTGYGNID
	369	388	KAVCFPKQPRTEANPALT VH

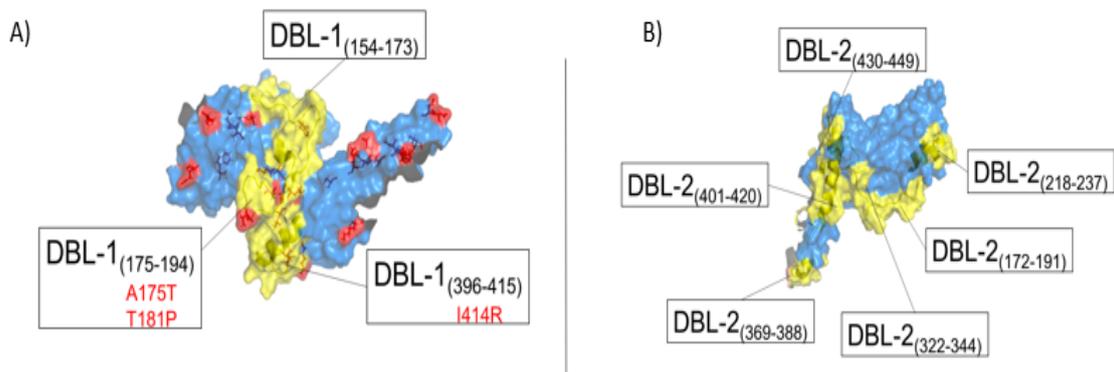


Figura 21. Estrutura de modelagem e análise *in silico* de epítomos das MSPDBL-1 e MSPDBL-2. Nos quadrados estão os epítomos preditos para MSPDBL-1 (A) e MSPDBL-2 (B).

MSPDBL-1

MKKIYSIFFSLFILNLHIYIKNIKCNDLINYNSLNRGLLNNSLDLTNGLNKNKDNSFIDSKIEEHENKSYQNKDNNISIVGQDVPITSVY
P3
SSKIINANDI FGNSIDDTKGLSVTNSGFDDGSAFGGGLPFSGYSP LQGNHNKCPDENFCKGIKNVLS CPPKNSTGRNGDWISVAVK
P1
ESSTNKGVLVPPRRTKLCLRNINKVWHRIKDEKNFKEEFVKVALGESNALMKHYKEKNLNALTAIKYGFSDMGDIKGTDLIDYQIT
KNINRALDKILRNETSNDKIKRVDWWEANKSAFWDAFMCGYKVHIGNKPCPEHDNMDRIPQYLRWFREWGTYVCSEYKKNKFED
P2
VIKLCNIQQFTNQDDSQLLEISKDKCKEALKHYE EWVNRPRPEWKGQCDKFEKEKSKYEDTKSITAEKYLKEICSECCKYKDLD
NTFKEFKDNVTLKKAVIDNKKNQDSLTTTSLSTSINSVRDSSNLDQRGNITTSQGNSHRATVVQVDQTNRLDNVNSVTQRGNNNY
NNLERGLGSGALPGTNIITEEKYSLELIKLT SKDEEDIKHNEVDVREEIEEQEDIEEDEEELENEGETKEEDEEKNETNDTETD
DTEDEIEEENKEKELSNOQQSEKKSISKVDEDSYRILSVSYKDNNEVKNAESIVKKLFLSFLNDNNLETIFKGLTEDMTDLFQK

MSPDBL2

MIYLSIVFYIFFLHIDIYVNIYSTCFVNEGPNLNRNNIINDELK GKAYNNTIDANNQIEYNKLNKHNVNSSHISKFSDIMDQFDKGD
P6
NENSHDIKFEEKKNINKSLDAESNYGINEISITGNDSDNSNQNIFFDGSSELAGGIPRSIYTINLGFNKCPTEEICKDFSNLPQCRKN
P6
VHERNNWLGSSVKNFSSDNKGVLPVPPRRQSLCLRITLQDFRTK KKKKEGDFEKFIYSYASSEARKI RTIHNNLEKAHQAIRYSFADI
P8
GNIIRGDDMMDTPTS KETITYLEKVLKIYNENNDKPKDAKKWWTENRHHVWEAMMCGYQSAQKDNQCTGYGNIDIPQFLRWF
P9 P5 P7
EWGTYVCEESEKNMNTLKAVCFPKQPRTEANPALT VHENEMCSSTLKKYEEWYNKRKTEWTEQSIKYNNDKINYTDIKTLSPSEY
P7
LIEKCECKCTKKNLQDV FELTFDGKALLEK LKKEESPVSNSVNALPEPGQITLPDPSLKQTTQENQPVVETPVTTAVINEHQGQT
EPNKGDNNNERENHESNVGSIQEVNQGSVSEESHKIDPSKIDDRLELSSGSSLEQHSKEDVKKGCALELVPLSLSDIEQIANES
EDVLEEEIEEINTDGEIEYITEEEIKEDIEEETEEDIEEETEETEEETEEETEEADEETVKEIEDKPEQEIKNKSLEEKQIDKNTDTSEKKG
NNSEKDEKARNLISKNYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSKDITNLFKN

Figura 22. Epítópos preditos (em Vermelho), com a utilização do software BCPreds, dentro da região DBL (em azul) nas proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.

4.5 Mapeamento de epítomos

A pesquisa de anticorpos IgG específicos para os epítomos das regiões DBL das proteínas MSP-DBL1 e MSP-DBL-2 (aqui representados pelos peptídeos P1, P2 e P3 da MSPDBL-1 e P4, P5, P6, P7, P8 e P9 da MSPDBL-2) foi realizada em todas as amostras que possuíam anticorpos IgG contra a proteína recombinante correspondente.

Para a MSPDBL-1, verificamos que 41,2% (52/126) dos indivíduos não apresentavam anticorpos que reconheciam pelo menos um dos epítomos enquanto 58,8% (74/126) dos indivíduos apresentavam anticorpos que reconheciam pelo menos um dos epítomos: 23% (29/126), 18,3% (23/126) e 17,5% (22/126) dos indivíduos apresentavam anticorpos que reconheciam 1, 2 e 3 epítomos respectivamente. Para a MSPDBL-2, verificamos que 25,2% (32/127) dos indivíduos não apresentavam anticorpos que reconheciam pelo menos um dos epítomos enquanto 74,8% (95/127) dos indivíduos apresentavam anticorpos que reconheciam pelo menos um dos epítomos: 26,8% (34/127), 9,4% (12/127), 9,4% (12/127), 13,4% (17/127), 7,1% (9/127) e 8,6% (11/127) dos indivíduos apresentavam anticorpos que reconheciam 1, 2, 3, 4, 5 e 6 epítomos respectivamente (Figura 23).

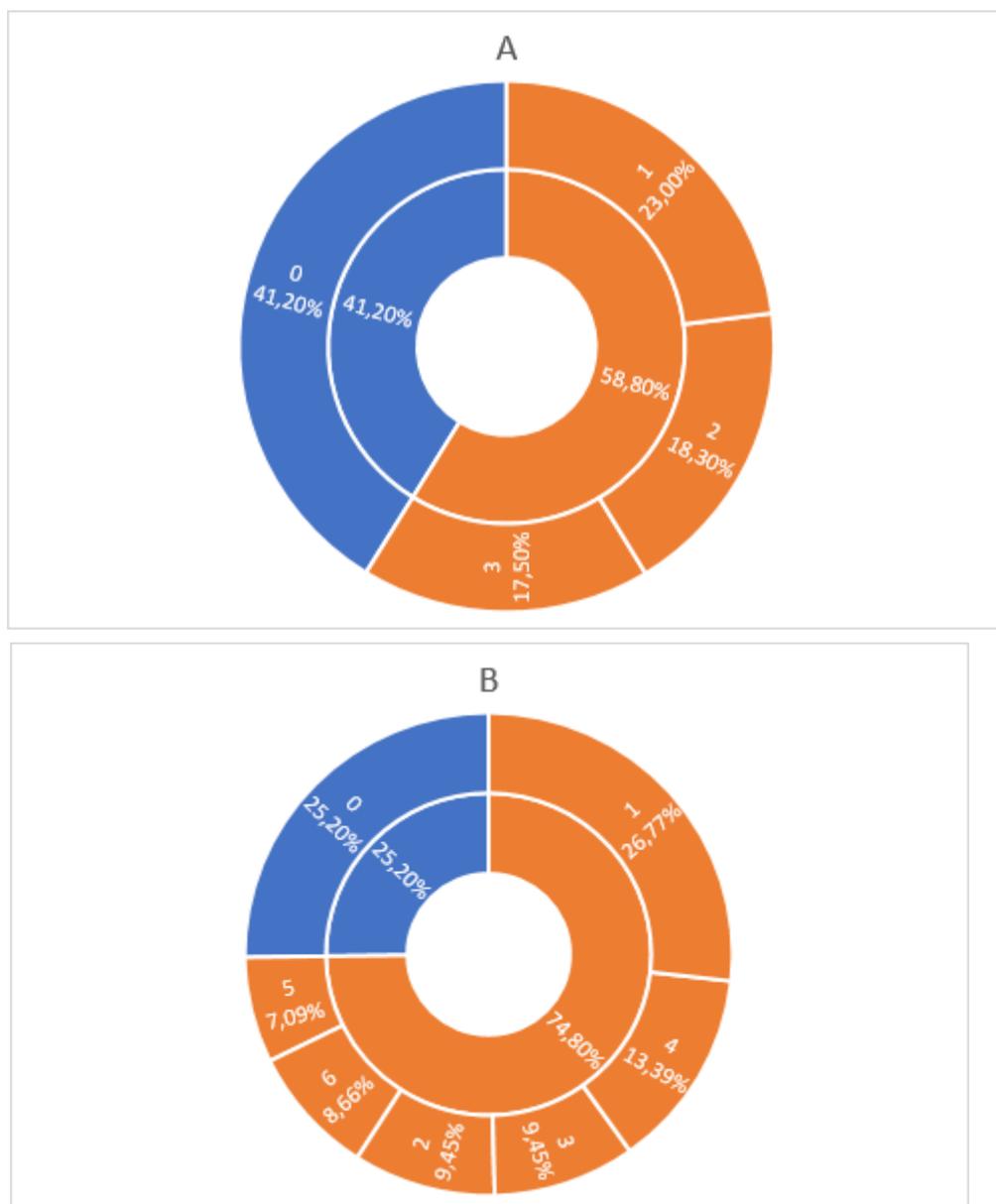


Figura 23. Número de epítomos das proteínas MSPDBL-1 (A) e MSPDBL-2 (B) reconhecidos pelos anticorpos dos indivíduos estudados.

As prevalências de indivíduos com anticorpos contra os epítomos P1, P2 e P3 da MSPDBL-1 foram, respectivamente, 38,9% (49/126), 30,1% (38/126) e 42,9% (54/126). Para os epítomos P4, P5, P6, P7, P8 e P9 da MSPDBL-2, as prevalências foram, respectivamente, 43,3% (55/127), 41,7% (53/127), 35,4% (45/127), 33,9% (43/127), 37% (47/127) e 24,4% (31/127). As prevalências de indivíduos com anticorpos que reconhecem os epítomos da MSPDBL-1 e MSPDBL2 foram similares. Entretanto, observamos uma maior prevalência de indivíduos com anticorpos IgG que reconhecem os epítomos P3 da MSPDBL-1 e P4 da MSPDBL-2 quando comparada a

prevalência de indivíduos que reconhecem o epítipo P2 da MSPDBL-1 e P9 da MSPDBL-2 (Figura 24).

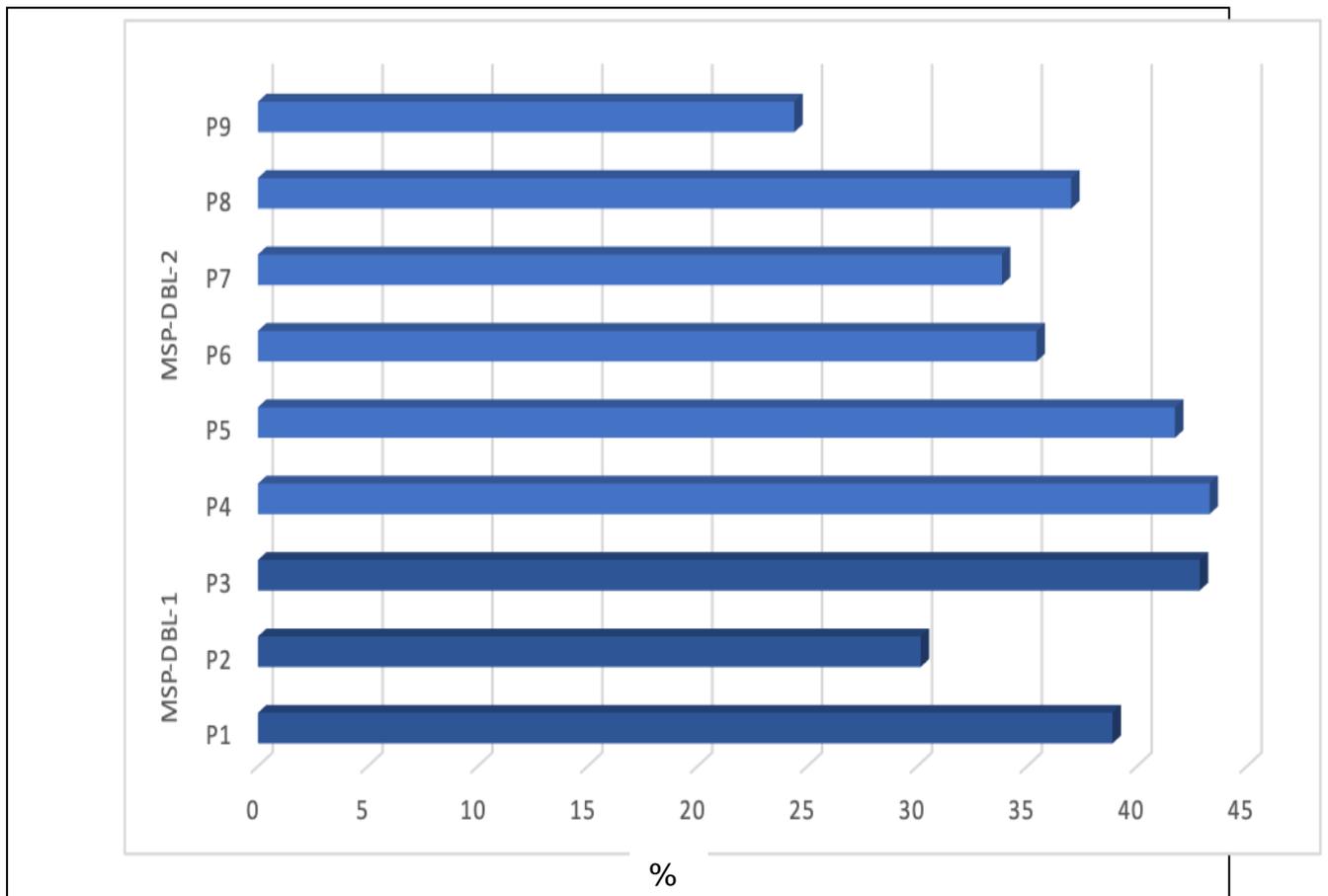


Figura 24. Prevalência de indivíduos com anticorpos contra os epítomos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.

Para os epítomos da MSPDBL-1, observamos que 29,8% dos indivíduos apresentavam anticorpos que reconheciam os epítomos P1, P2 e P3 simultaneamente, enquanto 18,9% dos indivíduos apresentavam anticorpos que reconheciam os epítomos P1 e P3 simultaneamente ou P3 individualmente (Figura 25). Para os epítomos da MSPDBL-2, verificamos que a maiores frequências de ocorrência foram para os epítomos P4 individualmente (14,6%) e para os epítomos P4, P5, P6, P7, P8 e P9 simultaneamente (11,5%) e P8 individualmente (11,5%) (Figura 26).

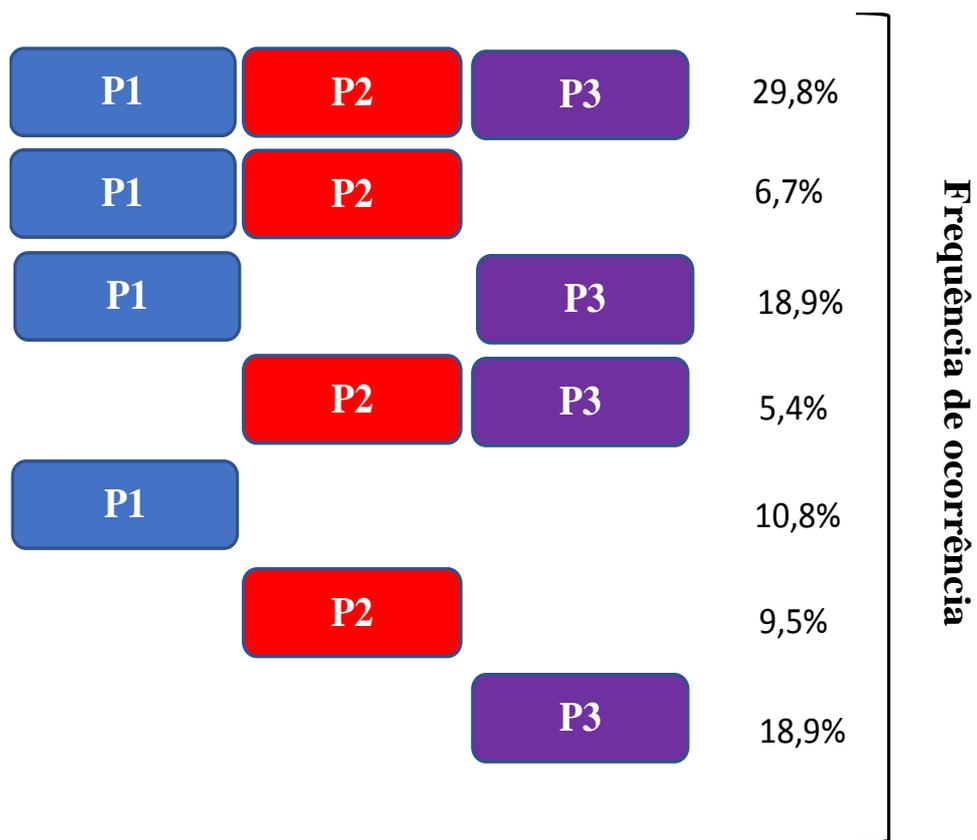


Figura 25. Frequência de ocorrência de indivíduos com anticorpos IgG para os epítomos P1, P2 e P3 da MSPDBL-1.

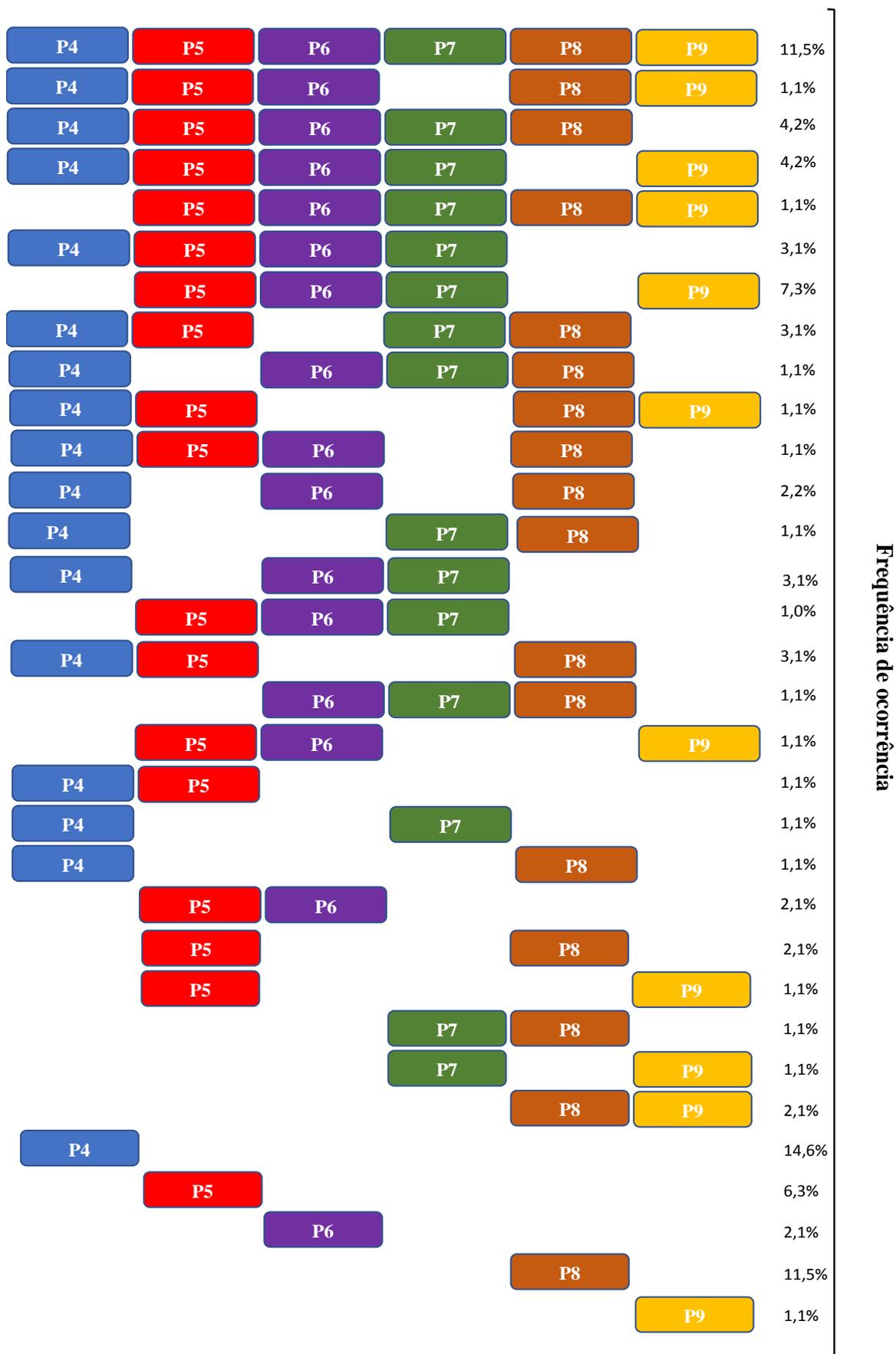


Figura 26. Frequência de ocorrência de indivíduos com anticorpos IgG para os epítotos P3, P4, P5, P6, P7, P8 e P9 da MSPDBL-2.

Não observamos diferenças nos índices de reatividade dos anticorpos IgG contra os epítomos P1, P2 ou P3 da MSPDBL-1 e P4, P5, P6, P7, P8 e P9 da MSPDBL-2 (Figura 27).

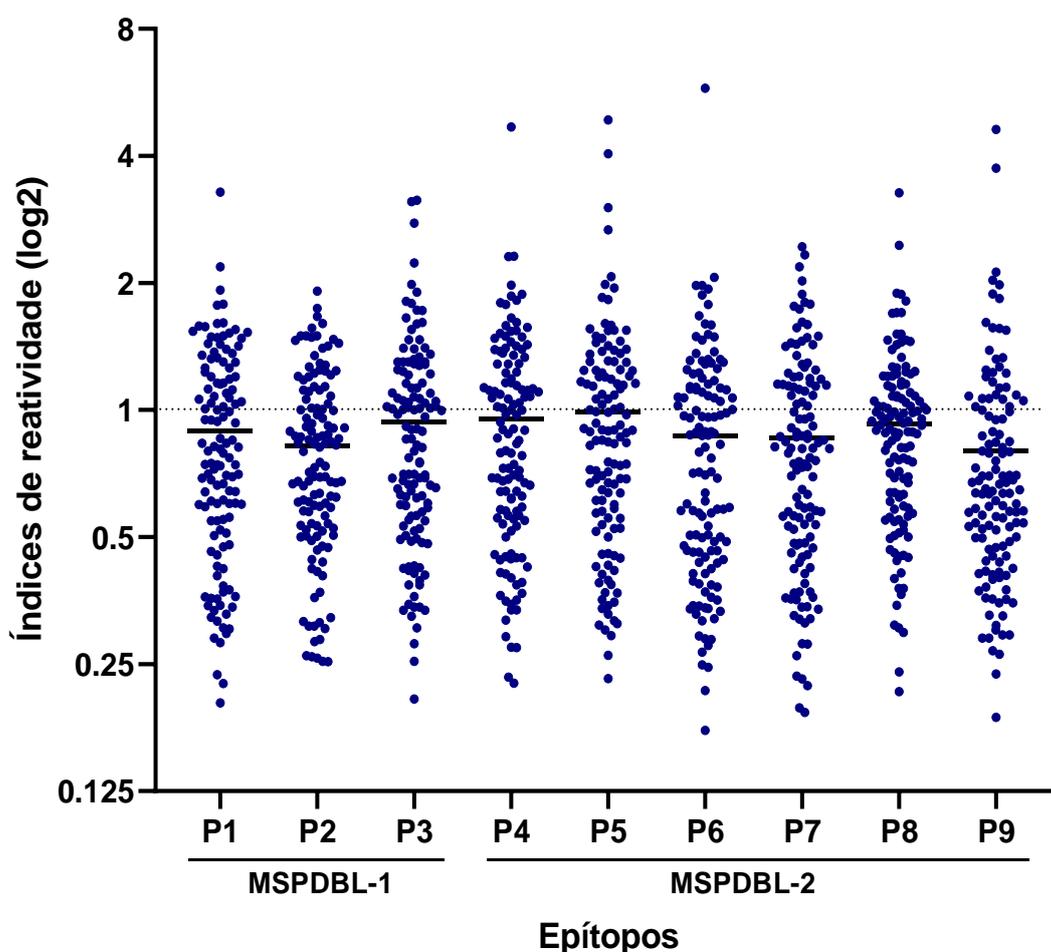


Figura 27. Índice de reatividade de anticorpos IgG contra os epítomos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.

Nenhuma correlação foi observada entre os índices de reatividade dos anticorpos IgG contra os epítomos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 e idade, tempo de residência em área endêmica de malária, tempo desde a última infecção ou número de infecções anteriores de malária. Também não observamos associação entre os índices de reatividade dos anticorpos IgG contra os epítomos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 e a infecção por *P. falciparum* (Figura 28).

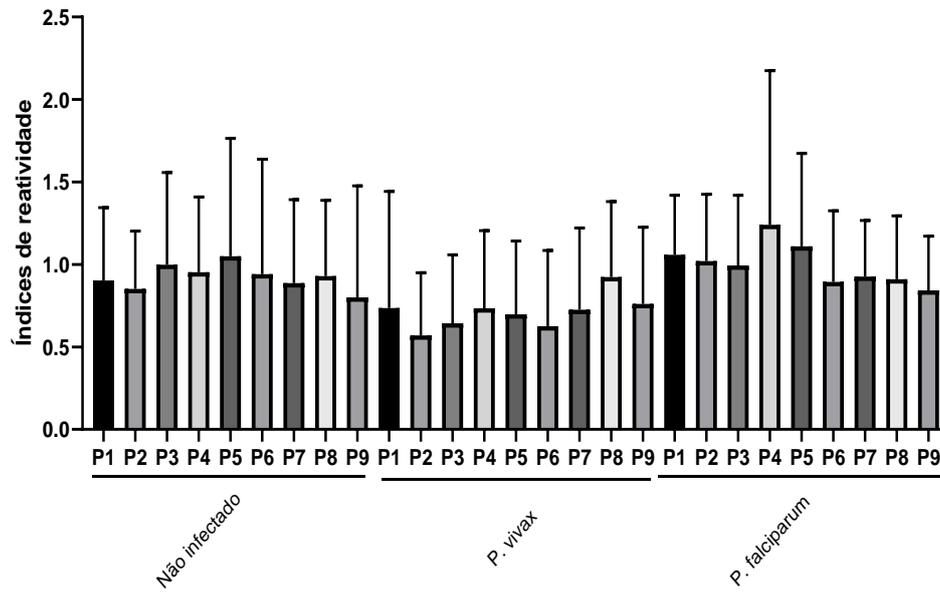


Figura 28. Índices de reatividade dos anticorpos IgG contra os epítotos das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em indivíduos não infectados por *P. vivax* ou infectados por *P. falciparum*.

5 DISCUSSÃO

A luta contra a malária permanece como um grande desafio devido a crescente resistência do *Plasmodium* sp. aos antimaláricos e a dispersão de anofelinos resistentes aos inseticidas, ressaltando a importância de estratégias alternativas para o controle desse problema da saúde pública mundial. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina antimalárica eficaz, capaz de induzir resposta imune estéril e duradoura torna-se a melhor ferramenta para combate a essa doença e tem sido uma das principais prioridades de pesquisa para o enfrentamento desse problema.

Como a patogenia da malária é decorrente do estágio eritrocítico do ciclo, as vacinas que são direcionadas ao estágio sanguíneo assexuado se tornam promissoras, visto que essa abordagem vacinal pode impedir a doença clínica diminuindo assim a sua morbidade e mortalidade. Assim, os merozoítos representam um importante alvo vacinal porque estão expostos ao sistema imune do hospedeiro antes da invasão no eritrócito e, desse modo, vários antígenos expostos na superfície do merozoíto têm sido caracterizados como alvos vacinais.

As proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são dois membros atípicos da família P/MSP-3 e são expressas na superfície do merozoíto e se associam periféricamente com outras MSPs para a formação de um complexo na superfície do merozoíto. Embora a sua função biológica ainda não tenha sido completamente elucidada, elas apresentam um papel na ligação do merozoíto com o eritrócito (152). Estudos realizados em áreas de alta endemicidade de malária mostraram que anticorpos contra a MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estão associados com a proteção contra malária clínica em áreas endêmicas da África e Oceania (157) e que esses anticorpos são capazes de inibir o crescimento do parasita *in vitro*, sugerindo seu importante papel na imunidade antimalárica (152,157,166). Entretanto, a constituição genética da população exposta e a circulação de parasitos geneticamente distintos em diferentes áreas endêmicas de malária podem influenciar a resposta imune aos antígenos vacinais. Portanto, é importante avaliar a resposta imune a antígenos candidatos a uma vacina em populações de áreas endêmicas de malária com diferentes cenários epidemiológicos. No presente trabalho, procuramos estudar, sob diversos aspectos, o perfil da resposta anticorpo contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 de

Plasmodium falciparum em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária brasileira, com diferentes níveis de transmissão. Esse é o primeiro estudo que avalia a antigenicidade e imunogenicidade das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 em áreas endêmicas da Amazônia brasileira.

A resposta imune humoral contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foi avaliada em indivíduos residentes em três cidades da Amazônia Brasileira: Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima, no Acre, e Guajará, no Amazonas. Essas áreas foram selecionadas, pois estão entre as 10 cidades que concentram 70% da malária por *P. falciparum* no país. Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima são consideradas áreas de alta endemicidade de malária (IPA > 50) e Guajará é considerada área de média endemicidade (IPA >10 e < 50).

Os indivíduos de Cruzeiro do Sul (CZS), Mâncio Lima (ML) e Guajará (GJ) eram similares na distribuição por sexo, idade, procedência e exposição prévia ao *Plasmodium*, embora os indivíduos do grupo ML tenham relatado uma maior média de número de infecções anteriores de malária que os indivíduos dos grupos GJ e CZS, mesmo sendo CZS uma cidade de alta endemicidade (IPA > 50) como ML. A maior parte dos indivíduos declarou infecção anterior tanto por *P. falciparum* quanto por *P. vivax*. Entretanto, a espécie plasmodial infectante mais prevalente foi *P. vivax*, refletindo o atual cenário de malária no Brasil, onde *P. vivax* é responsável por cerca de 88% das infecções (167).

Considerando que análises de população genômica em outros trabalhos, revelaram um grande número de polimorfismos no domínio DBL das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2, fato observado também por nosso grupo nas áreas endêmicas estudadas (168), indicando que essa região das proteínas esteja sofrendo intensa pressão imunológica (150,168), nosso trabalho focou na avaliação da resposta imune contra o domínio DBL das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 nos 299 indivíduos residentes em CZS, ML e GJ.

A avaliação da resposta imune, independente da classe de anticorpos ou subclasse de IgG mostrou que a MSPDBL-1 e a MSPDBL-2 são naturalmente imunogênicas em indivíduos residentes na Amazônia brasileira visto que mais da metade dos indivíduos estudados apresentavam anticorpos que reconheciam a MSPDBL-1 (59%) e MSPDBL-2 (54%). Adicionalmente, nossos dados mostraram que

esses anticorpos foram principalmente da classe IgG, com uma ampla faixa em magnitude de resposta. Entretanto, nossos dados diferem dos observados por Richards e colaboradores que relataram prevalências de 93,7% e 90,3% de indivíduos com anticorpos contra a MDPDBL-1 e MSPDBL-2 em Papua Nova Guiné (169). As diferenças observadas na imunogenicidade natural da MSPDBL-1 e MSPDBL-2 pode ser resultado das diferenças observadas na endemicidade das áreas estudadas, na exposição, na idade e no tempo de residência das populações estudadas visto que vários estudos têm demonstrado o efeito direto desses parâmetros no desenvolvimento da resposta imune antiplasmodial (170-173). Outra hipótese é que a diferença no *background* genético das populações estudadas e os polimorfismos existentes nos genes que codificam a MSPDBL-1 e MSPDBL-2 estejam influenciando no desenvolvimento da resposta imune específica. Estudos genéticos serão realizados para tentar avaliar essa possibilidade.

Desde os ensaios de transferência passiva de imunoglobulinas (Igs) de indivíduos imunes à malária para indivíduos infectados não imunes, realizados por Cohen e McGregor nos anos 60 (58,75) demonstrando claramente que a transferência de um pool de IgG imune (obtido a partir de soros de indivíduos de uma área hiperendêmica na Costa do Marfim) são capazes de transferir proteção contra o plasmódio de um indivíduo para outro, se tem conhecimento do papel fundamental dos anticorpos IgG na imunidade antimalárica. Desse modo, a observação que a maioria dos anticorpos naturalmente adquiridos que reconhecem a MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são da classe IgG, pode sugerir que anticorpos anti-MSPDBL-1 e anti-MSPDBL-2 podem participar da aquisição de uma imunidade antimalárica.

Anticorpos naturalmente adquiridos contra vários antígenos plasmodiais estão associados com idade e tempo de exposição à malária em regiões endêmicas, um fenômeno que tem sido frequentemente relatado para vários antígenos (170-172,174-181), provavelmente refletindo a exposição natural ao *P. falciparum* e, possivelmente, a maturação do sistema imune. Entretanto, em nosso estudo, nenhuma associação foi observada entre a resposta anticorpos anti-MSPDBL-1 ou anti-MSPDBL-2 e idade, tempo de residência em área endêmica de malária, número de infecções anteriores de malária. Pelo menos três hipóteses podem ser evocadas para explicar esse resultado. A primeira baseia-se no fato de que o número de infecções anteriores de malária pode estar sendo subestimado devido à dificuldade dos indivíduos não terem a exata lembrança do número de episódios anteriores desde a infância. A segunda

hipótese baseia-se no fato de que os indivíduos que residem há vários anos em área endêmica de malária podem ter desenvolvido um certo grau de imunidade antimalárica, após terem apresentado vários episódios de malária, relatando, assim, menos episódios de malária clínica. Recentes trabalhos têm relatado um considerável número de infecções oligo e assintomáticas entre indivíduos com grande tempo de exposição (18 anos em média), que vivem em áreas hipoendêmicas de transmissão instável do Brasil (182,183). A terceira hipótese baseia-se no fato de que devido à alta prevalência de *P. vivax* em relação a *P. falciparum* na área, o número de infecções anteriores de malária não significa necessariamente a estimulação de uma resposta imune para a antígenos específicos de *P. falciparum*.

A análise das prevalências dos níveis de anticorpos IgG e IgM contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 mostrou que as proteínas são imunogênicas, porém não foi possível mostrar associação entre a prevalência ou os níveis desses anticorpos e os sintomas no momento da coleta ou os níveis de parasitemia. Esses dados corroboram com os descritos na literatura que demonstram que a alta frequência de anticorpos antiplasmodiais IgG e/ou IgM numa população não reflete necessariamente o grau de proteção dessa população (184,185). A falta de associação entre os níveis de anticorpos IgG e IgM e a redução da parasitemia e/ou sintomatologia também pode ser explicada pelos baixos níveis de transmissão de *P. falciparum* observados nas áreas estudadas no período da coleta.

Em algumas infecções como, por exemplo, na toxoplasmose, a detecção de anticorpos da classe IgM representa um importante marcador no diagnóstico da doença, uma vez que a presença desses anticorpos pode ser utilizada para diferenciar uma infecção atual ou recente de uma infecção passada. A detecção de anticorpos IgM que reconhecem a MSPDBL-1 ou a MSPDBL-2 poderia sugerir uma infecção atual ou recente de malária. Entretanto, nenhuma relação foi observada entre anticorpos IgM-MSPDBL-1 ou IgM-MSPDBL-2 e infecção atual ou data da última infecção. Esses dados são semelhantes aos descritos por Balthazar-Guedes e colaboradores que demonstraram que, na malária, a resposta IgM não pode ser utilizada como indicadora de infecção atual ou recente (186).

Estudos sobre as respostas imune humoral contra antígenos de *P. falciparum* tem demonstrado constantemente que a imunidade contra o estágio sanguíneo depende de um padrão específico de subclasses de IgG (187,188). Considerando que

(i) indivíduos protegidos da malária clínica possuem altos níveis de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) contra antígenos plasmodiais; (ii) quanto maior o grau de proteção desses indivíduos, maior é a razão entre anticorpos citofílicos e não citofílicos (IgG2 e IgG4) e; (iii) anticorpos não citofílicos podem bloquear o mecanismo efetor dos anticorpos citofílicos (77,189-195) , avaliamos a qualidade da resposta anticorpo contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 pela análise das subclasses de IgG. A pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi realizada em todas as amostras que apresentaram anticorpos IgG para cada uma das proteínas estudadas. Anticorpos das 4 subclasses foram detectados no plasma dos indivíduos estudados.

Nossos dados mostraram que indivíduos naturalmente expostos à infecção malárica apresentam predominantemente anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) que reconhecem a MSPDBL-1 e MSPDBL-2, fato importante se considerarmos que a aquisição de uma imunidade protetora contra a malária está associada com a presença e altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 e reduzida proporção de IgG2 e IgG4 com a mesma especificidade visto que anticorpos não citofílicos bloqueiam os mecanismos efetores (77,196,197).

Trabalhos realizados em área de alta endemicidade de malária têm demonstrado correlação entre os níveis de anticorpos citofílicos para as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 e a parasitemia (78,191,198). Porém, em nosso trabalho não verificamos nenhuma correlação entre os níveis de anticorpos IgG1 e/ou IgG3 e/ou a relação entre anticorpos citofílicos e não citofílicos (dados não mostrados) e a parasitemia. Dados similares foram obtidos por Maya e colaboradores que também não observaram correlação entre níveis de anticorpos citofílicos para a proteína GLURP e parasitemia em um estudo realizado no Gabão (199). Um recente estudo que avaliou a resposta imune contra a GMZ2.6c e seus componentes, as proteínas GLURP, MSP3 e Pfs48/45 de *P. falciparum* com a mesma população estudada no presente trabalho também não observou relação entre níveis de anticorpos IgG1 ou IgG3 ou a relação entre anticorpos citofílicos /não citofílicos e a parasitemia (200). Uma possível explicação para esses resultados é o pequeno número de indivíduos parasitados por *P. falciparum* em nosso trabalho, apenas 43/299. Além disso, dos 43 indivíduos parasitados com *P. falciparum*, em apenas 21 foi possível quantificar parasitos nas lâminas. Os 22 indivíduos restantes foram diagnosticados por métodos moleculares.

Nossos dados mostraram que os níveis de anticorpos IgG contra a MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram maiores nos indivíduos parasitados por *P. falciparum* quando comparado aos indivíduos não parasitados ou parasitados por *P. vivax*. Esse resultado pode ser reflexo de uma estimulação do sistema imune levando a produção de anticorpos antiplasmodiais, entre os quais anticorpos anti-MSPDBL-1 e anti-MSPDBL2.

Embora existam fortes indícios de que os anticorpos estão associados à exposição cumulativa e proteção contra a malária, a relativa contribuição de diferentes regiões das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 na indução de anticorpos protetores é outro ponto importante a ser abordado (188). Assim, também mapeamos os epítomos lineares no domínio DBL em MSPDBL-1 e MSPDBL-2 usando ferramentas de predição *in silico* e validamos a antigenicidade por ELISA utilizando peptídeos sintéticos correspondentes ao epítomos identificados por predição. Três epítomos lineares na sequência DBL da MSPDBL-1 e seis epítomos lineares na sequência DBL da MSPDBL-2 foram identificados.

Não observamos nenhuma associação entre o número de epítomos reconhecidos com idade, tempo de residência ou número de infecções anteriores de malária. Esses dados diferem dos previamente descritos que observaram uma associação entre o número de epítomos reconhecidos por anticorpos de indivíduos residentes em Rondônia e idade, tempo de residência em área endêmica e número de infecções anteriores de malária (170).

Nossos dados mostraram que a maioria dos indivíduos avaliados apresentava anticorpos que reconheciam pelo menos um dos epítomos identificados, 58,8% para MSPDBL-1 e 74,8% para MSPDBL2, indicando que a predição *in silico* é uma ferramenta útil para identificação de epítomos de células B. Os epítomos P1 e P3 da MSPDBL-1 e P4 e P5 da MSPDBL-2 foram os epítomos preferencialmente reconhecidos pelos anticorpos presentes no plasma da população estudada. Apesar de serem reconhecidos em maior frequência, não foi observada diferença nos índices de reatividade dos anticorpos IgG contra cada um desses epítomos. Por conseguinte, o papel funcional destes anticorpos precisa de ser avaliado.

O Polimorfismo em muitos antígenos da malária é característica em muitas regiões imunodominantes desses antígenos. Polimorfismos são causados por variações na sequência de repetições em tandem e resultam de pontes de mutações

que tem sido descrito em diversos genes com ou sem regiões repetidas (201). Polimorfismos dos epítomos de células B e T de antígenos do parasito podem ser capazes de escapar da resposta do sistema imune (202). Em estudos realizados na África, foi avaliado o polimorfismo dos genes candidatos associados à vacina da malária contra as proteínas encontradas nos três estágios de vida do plasmódio, que tem estado em alto nível há muito tempo (203). No trabalho realizado por Lemos (168) (2021), foi observado que a maioria das mutações não sinônimas não resultou em grande alteração no potencial dos epítomos preditos. Entretanto, as mutações quando ocorrem juntas causam drástica diminuição do escore do epítomo, excluindo-o de ser potencial epítomo. O trabalho também mostrou que os isolados de *P. falciparum* que circulam em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará apresentam extensiva diversidade genética e os polimorfismos de uma única base que acarretam mutações não sinônimas podem impactar os epítomos T e B imunodominantes da MSPDBL-1 e MSPDBL-2. Nesse sentido, avaliar os polimorfismos genéticos em regiões que codifiquem epítomos imunodominantes é importante para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica pelo potencial de escape do parasito ao sistema imune.

A demonstração de que uma proteína de merozoíto é naturalmente imunogênica nas populações residentes em área endêmica da Amazônia brasileira e que a resposta anticorpo contra essa proteína pode participar do processo de aquisição de uma imunidade ressalta a importância dessa proteína como candidata vacinal. Entretanto, estudos adicionais em outras áreas endêmicas, com população com outros *backgrounds* genéticos, além da avaliação do papel funcional dos anticorpos são importantes para confirmar o potencial da MSPDBL-1 e MSPDBL-2 como candidatas vacinais. A compreensão da imunidade humana adquirida naturalmente à malária é também importante por razões que vão para além do desenvolvimento de vacinas.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pretendemos:

- Avaliar o papel funcional dos anticorpos anti-MSPDBL-1 e anti-MSPDBL-2 sobre o crescimento *in vitro* de *P. falciparum*, em presença e ausência de monócitos, e em ensaios de fagocitose.
- Estudar a associação entre os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II e a resposta humoral contra as proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2.
- Avaliar a extensão do polimorfismo genético das proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 e sua influência nos epítomos B imunodominantes.

7 CONCLUSÕES

- As proteínas MSPDBL-1 e MSPDBL-2 são naturalmente imunogênicas em indivíduos residentes na Amazônia brasileira.
- Os anticorpos que reconheciam a MSPDBL-1 e MSPDBL-2 principalmente da classe IgG e, dentre as subclasses de IgG, os anticorpos contra as proteínas MSPDBL1 e MSPDBL-2 foram predominantemente citofílicos e os níveis de anticorpos IgG e IgG1 contra a MSPDBL-1 e MSPDBL-2 foram maiores nos indivíduos parasitados por *P. falciparum* podendo refletir *booster* do sistema imune em resposta à infecção.
- Análise de predição *in silico* pode ser utilizada como importante ferramenta para identificação de epítomos B de potenciais candidatos vacinais e os epítomos B identificados como imunodominantes na população estudada foram P1 e P3 da MSPDBL-1 e P4 da MSPDBL-2.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neves DP, Melo AL, Linardi, PM e Vitor, RWA. Parasitologia Humana. 11ª edição. Editora Atheneu; 2010.
2. Neves DP, Melo AL, Linardi PM e Vitor RWA. Parasitologia Humana. 13ª edição. São Paulo: Editora Atheneu; 2016.
3. Rey, L. Parasitologia. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2001.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2020.
5. Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? Braz J Infect Dis. 2010;14(3):299-309.
6. World Health Organization. World Malaria Report 2016. WHO: 2016.
7. Fioravante C. De macacos para gente. Revista Pesquisa FAPESP. 2017 dez. Edição 262.
8. Arruda ME, Nardin EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH 1989. Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg 41: 379-385.
9. Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet. 2004. 363: 1017–24.
10. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. *Plasmodium knowlesi*: the emerging zoonotic malaria parasite. Acta Tropica. 2013. 125(2): 191-201.
11. Yusof R, Lau YL, Mahmud R, Fong MY, Jelip J, Ngian HU *et al.* High proportion of *knowlesi* malaria in recent malaria cases in Malaysia. Malaria Journal. 2014. 13:168.
12. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. Malaria Journal. 2014. 13:68.
13. Lalremruata A, Magris M, Vivas-Martínez S, Koehler M, Esen M, Kempaiah P, Jeyaraj S. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. E Bio Medicine. 2015. 1186-1192.
14. Alvarenga DAM, Culleton R, Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco Jr. C, Silva S *et al.* An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. Scientific Reports. 2018. 8:86.
15. World Health Organization. World Malaria Report 2020: 20 Years of global progress & challenges. WHO: 2020.
16. Sá MR. Os estudos em malária aviária e o Brasil no contexto científico internacional (1907-1945). História, Ciência e saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro. 2011. Vol. 18, no. 2: p. 499-518.
17. Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.
18. Weimin Liu¹, Yingying Li¹, Gerald H. Learn¹, Rebecca S. Rudicell², Joel D. Robertson¹, Brandon F. Keele, *et al.* Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. NIH Public Access. 2010. 467 (7314): 420–425.

19. Liu W, Li Y, Shaw KS, Learn GH, Plenderleith LJ, Malenke JA, *et. al.* African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. Nature Communications. 2014. 5:3346.
20. Cox FE. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev 2002;15(4):595-612.
21. Sigerist HE. A History of medicine, Vol. I. Primitive and Archaic Medicine, Oxford University Press, New York 1951.
22. Ebbell B. The Papyrus Ebers: the Greatest Egyptian Medical Document. Copenhagen, Denmark (citado por Carter & Mendis 2002) 1937.
23. Hippocrates (English translation by WHS Jones). Air, Water and Places, Heinemann, London 1923.
24. OPAS/OMS. Malaria. 2021. <https://www.paho.org/pt/topicos/malaria>
25. World Health Organization. Malaria. 2021.
26. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria. CDC: 2020.
27. BRASIL. Ministério da Saúde. Malária 2020. Boletim Epidemiológico. 2020; número especial.
28. Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 229-237.
29. Gadelha P 1998. Conforming strategies of public health campaigns to disease specificity and national contexts: Rockefeller Foundation's early campaigns against hookworm and malaria in Brazil. Parassitologia 40: 159-175.
30. Schweickardt JC, Lima NT 2010. From "flowery hell" to the hope of sanitation: Science, nature and health in the State of Amazonas during Brazilian First Republic (1890-1930). Bol Mus Para Emilio Goeldi Cienc Hum 5: 399-415.
31. Stepan NL 2003. The only serious terror in these regions: malaria control in the Brazilian Amazon. In D Armus, Disease in the history of modern Latin America, Duke University Press, Durham, p. 25-50
32. Packard RM, Gadelha P 1997. A land filled with mosquitoes: Fred L Soper, The Rockefeller Foundation and the *Anopheles gambiae* invasion of Brazil. Med Anthropol 17: 215-238.
33. CRUZ, Oswaldo. Relatório sobre as condições médico-sanitárias do Vale do Amazonas apresentado a S. Exa. o Sr. Dr. Pedro de Toledo, Ministro da Agricultura, Indústria e Comércio. In: Cruz, Oswaldo; Chagas, Carlos; Peixoto, Afrânio. Sobre o saneamento da Amazônia. Manaus: Philippe Daou. p.45-155. 1.ed. 1913. 1972.
34. CHAGAS, Carlos. Notas sobre a epidemiologia do Amazonas, Brazil Médico, Rio de Janeiro, v.27, n.42, p.450-456. 1913.
35. SOPER, Fred L.; WILSON, Bruce D. *Anopheles gambiae* no Brasil: 1930-1940. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2011
36. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015. Vol. 110(6): 701-718.
37. BRASIL. Ministério da Saúde. SVS. Boletim epidemiológico da malária. Brasília: Secretaria de vigilância em saúde; 2004. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=124
38. BRASIL. Ministério da Saúde. SVS. Boletim epidemiológico da malária. Brasília: Secretaria de vigilância em saúde; 2004. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=124
39. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG3, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil, PL e Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. Malaria Journal. 2010. 9: 115.

40. Pina A, Bressan CS, Pedro RS, Valls-de-Souza R, Silva S, Souza PR *et al.* Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2010. 43(5):571-574.
41. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Malária 2020. Número Especial. Brasília: 2020.
42. Bousema T and Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin. Microbiol. Ver.* 2011. 24(2): 377-410.
43. Thera MA, Plowe C V. Vaccines for malaria: how close are we? *Annu Rev Med.* 2012. 63:345–57
44. Frischknecht F, Matuschewski K. *Plasmodium* Sporozoite Biology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017, May. 7(5)
45. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, *et al.* Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2010, Oct. 26:107(43):18640 LP – 18645.
46. Voza T, Miller JL, Kappe SHI, Sinnis P. Extrahepatic exoerythrocytic forms of rodent malaria parasites at the site of inoculation: clearance after immunization, susceptibility to primaquine, and contribution to blood-stage infection. *Infect Immun.* 2012, Jun. 80(6): 2158–64
47. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends Parasitol.* 2015, Aug. 31(8): 357–62.
48. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz J-F, *et al.* Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe.* 2008, Feb. 3(2): 88–96.
49. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, *et al.* Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science.* 2001, Jan. 291(5501): 141–4.
50. Mota MM, Giordano S, Rodriguez A. Targeting *Plasmodium* host cells: survival within hepatocytes. *Trends Mol Med.* 2004, Oct. 10(10): 487–92.
51. Sturm A, Amino R, Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A *et al.* Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science.* 2006. 313: 1287.
52. Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res.* 2011, Jan. 108(1): 247–52.
53. Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Mizukami H, Fukumoto S, Yamamoto DS, *et al.* A viral-vectored multi-stage malaria vaccine regimen with protective and transmission-blocking efficacies. *Frontiers and Immunology.* 2019. Vol. 10: article 2412.
54. Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, Sinden RE, Leroy D. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. *Plos Medicine.* 2012. Vol. 9, no. 2: e1001169.
55. Cowman AF e Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Leading Edge Review.* Elsevier. 2006. 124, 755-766
56. Singh M, Suryanshu, Kanika, Singh G, Dubey A, Chaitanya RK. *Plasmodium's* journey through the Anopheles mosquito: A comprehensive review. *Biochimie.* 2021 Feb;181:176–90.
57. Sinden RE. The cell biology of malaria infection of mosquito: advances and opportunities. *Cell Microbiol.* 2015. Vol. 17, n. 4, p. 451-66.
58. Cohen S, Mc GI, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961.192:733-7.

59. Sergent E, Parrot L. L'immunité, la prémunition et la résistance innée, Arch Inst Pasteur Alger 1935;3:279.
60. Perignon JL, Druilhe P. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994;89 Suppl 2:51-3.
61. Ly A, Hansen DS. Development of B cell memory in malaria. Frontiers in Immunology. 2019. Vol. no. 10: art. 559.
62. Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PEM, Silva LHP. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 102(3): 271-276, 2007.
63. Teo A, Feng G, Brown GV, Beeson JG, Rogerson SJ. Functional antibodies and protection against blood-stage malaria. Trends of Parasitology. 2016. Vol. no. 20: p. 12.
64. Silveira ELV, Dominguez MR, Soares IS. To be or not be: Understanding B Cell in the Development of Malaria Infection. Fronties in Immunology. 2018. Vol. 9. 2961.
65. Fowkes FJI, Richards JS, Simpson JÁ, Beeson JG. The Relationship between Anti-merozoite Antibodies and Incidence of *Plasmodium falciparum* Malaria: A Systematic Review and Meta-analysis. Plos Medicine. 2010. Vol. 7. Issue 1: e1000218.
66. Persson KEM, Fowkes FJI, McCallum FJ, Gicheru N, Reiling L, Richards JS, et al. Erythrocyte-Binding Antigens of *Plasmodium falciparum* Are Targets of Human Inhibitory Antibodies and Function To Evade Naturally Acquired Immunity. J Immunol. 2013, Jul. 15: 191(2): 785–94.
67. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJI, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. FEMS Microbiol Rev. 2016. (40): 343–72.
68. Hill DL, Eriksson EM, Li Wai Suen CSN, Chiu CY, Ryg-Cornejo V, Robinson LJ, et al. Opsonising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. PLoS One. 2013. 8(9): e74627.
69. Osier FH, Feng G, Boyle MJ, Langer C, Zhou J, Richards JS, et al. Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. BMC Med. 2014, Jul. 1: 12(1): 108.
70. Boyle MJ, Reiling L, Feng G, Langer C, Osier FH, Aspeling-Jones H, et al. Human antibodies fix complement to inhibit *plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. Immunity. 2015, Mar. 17: 42(3): 580–90.
71. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. Nat Rev Immunol. 2018, May. 18(5): 325–39
72. Raj DK, Nixon CP, Nixon CE, Dvorin JD, DiPetrillo CG, Pond-Tor S, et al. Antibodies to PfSEA-1 block parasite egress from RBCs and protect against malaria infection. Science. 2014, May. 23: 344(6186): 871–7.
73. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. J Clin Invest. 2010. 120(12): 4168–78.
74. McGregor, A. & Carrington, S.P. Treatment of east African *P. falciparum* malaria with west African human gamma-globulin Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1963. 57: 170-175.
75. Mc Gregor IA. The passive transfer of human malarial immunity. AM J Trop Med Hyg. 1964. 13:237-239

76. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1991. 45(3): 297-308.
77. Leoratti FMS, Farias L, Alves FP, Suarez-Mútiis MC, Coura JR, Kalil J et al. Variants in the Toll-Like Receptor Signaling Pathway and Clinical Outcomes of Malaria. *JID*. 2008.198:772– 80.
78. Ubillos I, Jiménez A, Vidal M, Bowyer PW, Gaur D, Dutta S, et al. Optimization of incubation conditions of *Plasmodium falciparum* antibody multiplex assays to measure IgG, IgG1–4, IgM and IgE using standard and customized reference pools for sero-epidemiological and vaccine studies. *Malar J*. 2018. 17:219
79. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun* 1992;60(4):1473-81.
80. Boundin C, Chumpitazi B, Dziegiel M, Peyron F, Picot S, Hogh B et al. Possible role of specific Immunoglobulin M Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigen in Immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso. *JCM*. 1993. Vol. 31, n° 3, p. 636-41.
81. Arama C, Maig B, Dolo A, Kourib B, Traoré B, Cromptonb PD et al. Ethnic differences in susceptibility to malaria: What have we learned from immuno-epidemiological studies in West Africa? *Acta Tropica*. 2015. Vol. 146. P. 152-156.
82. Boyle MJ, Chan JA, Handayani I, Reiling L, Feng G, Hilton A, et. al. IgM inhuman immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci. Adv*. 2019. 5: eaax4489.
83. Bolad A, Farouk SE, Israelsson E, Doloy A, Doumboy OK, Nebie´z I, Maigay B et al. Distinct Interethnic Differences in Immunoglobulin G Class/Subclass and Immunoglobulin M Antibody Responses to Malaria Antigens but not in Immunoglobulin G Responses to Nonmalarial Antigens in Sympatric Tribes Living in West Africa. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2005. 61, 380–386.
84. Doodoo D, Theisen M, Kurtzhals JA, Akanmori BD, Koram KA, Jepsen S, et al. Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2000;181(3):1202-5.
85. Richard D, MacRaild CA, Riglar DT, Chan JA, Foley M, Baum Jet al. Interaction between *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 and the Rhoptry Neck Protein Complex Defines a Key Step in the Erythrocyte Invasion Process of Malaria Parasites. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285, n°. 19, pp. 14815–14822.
86. Adu B, Cherif MK, Bosomprah S, Diarra A, Arthur FKN, Dickson EK et al. Antibody levels against GLURP R2, MSP1 block 2 hybrid and AS202.11 and the risk of malaria in children living in hyperendemic (Burkina Faso) and hypo-endemic (Ghana) areas. *Malar J*. 2016. 15:123.
87. Oyong DA, Loughland JR, SheelaNair A, Andrew D, Rivera FDL, Piera KA et al. Loss of complement regulatory proteins on red blood cells in mild malarial anaemia and in *Plasmodium falciparum* induced blood-stage infection. *Malar J*. 2019. 18:312.
88. Barry A, Behet MC, Nébié I, Lanke K, Grignard L, Ouedraogo A et al. Functional antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites are associated with a longer time to qPCR-detected infection among schoolchildren in Burkina Faso. *Wellcome Open Research*. 2019. 3:159.
89. Persson KEM, Fowkes FJI, McCallum FJ, Gicheru N, Reiling L, Richards JS, et al. Erythrocyte-Binding Antigens of *Plasmodium falciparum* Are Targets of Human Inhibitory Antibodies and Function To Evade Naturally Acquired Immunity. *J Immunol*. 2013, Jul. 15: 191(2): 785–94.

90. Arévalo-Herrera M, Solarte Y, Marin C, Santos M, Castellanos J, Beier JC, et al. Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2011. Vol. 106. Supl I: 202-211.
91. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham WH, Duraisingh MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host & Microbe*. 2017. 22(2):232-245.
92. Tan J, Piccoli L, Lanzavecchia A. The Antibody Response to *Plasmodium falciparum*: Cues for Vaccine Design and the Discovery of Receptor-Based Antibodies. *Annual Review of Immunology*. 2019. 37: 225-46.
93. Hoffman SL, Vekemans J, Richiea TL e Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. *HHS Public Access*. 2015. 33 (Suppl 4): D13-D23.
94. Miles A, Iqbal Z, Vauterin P, Pearson R, Campino S, Theron M, et al. Indels, structural variation, and recombination drive genomic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Genome Research*. 2016. 26:1288–1299.
95. Chrubasik C e Jacobson RL. Letter To The Editor The Development of Artemisinin Resistance in Malaria: Reasons and Solutions. *Phytotherapy Research*. Jun, 2010. 24: 1104-1106.
96. Kawada H, Dida GO, Ohas K, Komagata, O, Kasai S, Tomita, T, et. Multimodal Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors, *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* s.s., in Western Kenya. *Plos One*. Aug, 2011. Volume 6.
97. Courtin D, Oesterholt M, Huisman H, Kusi K, Milet J, Badaut C, et al. The Quantity and Quality of African Children’s IgG Responses to Merozoite Surface Antigens Reflect Protection against *Plasmodium falciparum* Malaria. *Plos One*. 2009. Vol. no. 4.
98. Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria Vaccine: Candidate Antigens, Mechanisms, Constraints and Prospects. *J. Immunology*. 2002: 56: 327-347.
99. Reed ZH, Kienya MP, Engers H, Friede M, Chang S, Longare S, et al. Comparison of immunogenicity of five MSP1-based malaria vaccine candidate antigens in rabbits. *Vaccine* 27. 2009.1651–1660
100. Ouattara A, Laurens MB. Vaccines against malaria. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2015 Mar;60(6):930–6.
101. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest*. 2010 Dec;120(12):4168–78.
102. Frimpong A, Kusi KA, Ofori MF, Ndifon W. Novel Strategies for Malaria Vaccine Design. *Front Immunol*. 2018;9:2769.
103. Chattopadhyay R, Kumar S. Malaria vaccine: latest update and challenges ahead. *Indian J Exp Biol*. 2009 Jul;47(7):527–36.
104. Arora N, Anbalagan LC, Pannu AK. Towards Eradication of Malaria: Is the WHO’s RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough? *Risk Management and Healthcare Policy*. 2021. 14:1033–1039.
105. Bemaniab P, Amirghofranc Z, Mohammadi M. Designing a multi-epitope vaccine against blood-stage of *Plasmodium falciparum* by in silico approaches. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2019. S1093-3263(20)30434-4.
106. Zheng J, Pan H, Gu Y, Zuo X, Ran N, Yuan Y, et al. Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. *Biomed Res Int*. 2019;2019:9751471.
107. Coelho CH, Rappuoli R, Hotez PJ, Duffy PE. Transmission-Blocking Vaccines for Malaria: Time to Talk about Vaccine Introduction. *Trends Parasitol*. 2019 Jul;35(7):483–6.

108. Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. Bull World Health Organ. 1979;57(Suppl. 1):165–73.
109. Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. Bull World Health Organ. 1979;57:165–73.
110. Clyde DF. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. Am J Trop Med Hyg. 1975, May. 24(3): 397-401.
111. Lyke KE, Ishizuka AS, Berry AA, Chakravarty S, DeZure A, Enama ME, et al. Attenuated PfSPZ Vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017. 114(10): 2711–6.
112. Tuju J, Kamuyu G, Murungi LM, Osier FHA. Vaccine candidate discovery for the next generation of malaria vaccines. British Society of Immunology. 2017.
113. Matuschewski K. Vaccines against malaria—still a long way to go. FEBS Journal. 2017. Pag: 2560-8.
114. Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner Jr. DG, Hall T, et al. A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS, S/AS02A in malaria-naïve adults. Elsevier. 2007.
115. Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2020. Vol. 16, no. 3, 480–489.
116. Bojang KA, Milligan PJM, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, et al. Efficacy of RTS, S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in the Gambia a randomized trial. The Lancet. 2001. 358: 1927-34.
117. Wilby KJ, Lau TTY, Gilchrist SE, Ensom MHH. Mosquirix (RTS,S): A Novel Vaccine for the Prevention of *Plasmodium falciparum* Malaria. The Annals of Pharmacotherapy. 2012. Volume 46.
118. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJF, van Gemert GJ, et al. Protection against a Malaria Challenge by Sporozoite Inoculation. N Engl J Med. 2009, Jul. 30;361(5): 468–77.
119. Roestenberg M, Teirlinck AC, McCall MBB, Teelen K, Makamdop KN, Wiersma J, et al. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. Lancet. 2011, May. 21;377(9779): 1770–6.
120. Seder RA, Chang L-J, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ, et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. Science. 2013, Sep. 20;341(6152):1359–65.
121. Ishizuka AS, Lyke KE, DeZure A, Berry AA, Richie TL, Mendoza FH, et al. Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. Nat Med. 2016, May. 9;22(6): 614–23.
122. O'Hara GA, Duncan CJA, Ewer KJ, Collins KA, Elias SC, Halstead FD, et al. Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: A potent new vaccine vector. J Infect Dis. 2012;205(5):772–81.
123. Ogwang C, Kimani D, Edwards NJNJ, Roberts R, Mwacharo J, Bowyer G, et al. Prime-boost vaccination with chimpanzee adenovirus and modified vaccinia Ankara encoding TRAP provides partial protection against *Plasmodium falciparum* infection in Kenyan adults. Sci Transl Med. 2015;7(286):286re5.
124. Vaughan AM e Kappe SHI. Malaria vaccine development: persistent challenges. Corrent Opnion in Immunology. 2012. 24: 324-331.

125. Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Lopez-Camacho C, Silva JHM, Perce-da-Silva DS, Têva A, et al. Plasmodium vivax Cell-Transversal Protein for Ookinetes and Sporozoites: Naturally Acquired Humoral Immune Response and B-Cell Epitope Mapping in Brazilian Amazon Inhabitants. *Frontiers and Immunology*. 2017. Vol. 8, article 77.
126. Cummings JF, Spring MD, Scwenk RJ, Ockenhouse CF, Kester KE, Polhemus ME et al. Recombinant liver stage antigen-1 (LSA-1) formulated with AS01 or AS02 is safe, elicits high titer antibody and induces IFN-gamma/IL-2 CD4+T cell but does not protect against experimental Plasmodium falciparum infection. *Infection Vaccine*. 2010. 28, 5135-5144.
127. Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, Gässler M, Imoukhuede EB, Imbault N, et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2009 Nov;27(49):6862–8.
128. Mordmüller B, Szywon K, Greutelaers B, Esen M, Mewono L, Treut C, et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambaréné, Gabon. *Vaccine*. 2010. 28(41):6698–703.
129. Bèlard S, Issifou S, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, Esen M, et al. A randomized controlled phase IB trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in african children. *PLoS One*. 2011. 6(7):1–8.
130. Jepsen MPG, Jogdand PS, Singh SK, Esen M, Christiansen M, Issifou S, et al. The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas. *J Infect Dis*. 2013. 208(3):479–88.
131. Sirima SB, Mordmüller B, Milligan P, Ngoa UA, Kironde F, Atuguba F, et al. A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. *Vaccine*. 2016. 34(38):4536–42.
132. Mamo H, Esen M, Ajua A, Theisen M, Mordmüller B, Petros B. Humoral immune response to *Plasmodium falciparum* vaccine candidate GMZ2 and its components in populations naturally exposed to seasonal malaria in Ethiopia. *Malar J*. 2013.12:51.
133. Baumann A, Magris MM, Urbaez M-L, Vivas-Martinez S, Durán R, Nieves T, et al. Naturally acquired immune responses to malaria vaccine candidate antigens MSP3 and GLURP in Guahibo and Piaroa indigenous communities of the Venezuelan Amazon. *Malar J*. 2012;11(1):46.
134. Baldwin SL, Roeffen W, Singh SK, Tiendrebeogo RW, Christiansen M, Beebe E, et al. Synthetic TLR4 agonists enhance functional antibodies and CD4+ T-cell responses against the Plasmodium falciparum GMZ2.6C multi-stage vaccine antigen. *Vaccine*. 2016 Apr;34(19):2207–15.
135. BRASIL. Instituto Oswaldo Cruz. Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalária GMZ2. 6c e seus componentes, Proteína 3 da Superfície do Merozoíto (MSP-3), Proteína Rica em Glutamato populações expo. Bárbara de Oliveira Baptista. Vol. 45. 2017.
136. Chitnis CE, Mukherjee P, Mehta S, Yazdani SS, Dhawan S, Shakri AR, et al. Phase I Clinical Trial of a Recombinant Blood Stage Vaccine Candidate for Plasmodium falciparum Malaria Based on MSP1 and EBA175. *Plos One*. 2015. 10(4): e0117820.
137. Garrido-Cardena JA, Mesa-Valle C, Manzano-Agugliaro F. Genetic approach towards a vaccine against malaria. *Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018.
138. Reddy KS, Pandey AK, Singh H, Sahar T, Emmanuel A, Chitnis CE et al. Bacterially Expressed Full-Length Recombinant *Plasmodium falciparum* RH5 Protein

- Binds Erythrocytes and Elicits Potent Strain-Transcending Parasite-Neutralizing Antibodies. *Infection and Immunity*. 2014. Vol. 82, n° 1, p. 152–164.
139. Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberg PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*. 2002. Vol. 418.
140. Seeberger PH, Soucy RL, Kwon YU, Snyder DA, Kanemitsu T. A convergent, versatile route to two synthetic conjugate anti-toxin malaria vaccines. *Chem. Commun.*, 2004, 1706–1707.
141. Bousema JT, Roeffen W, Van Der Kolk M, De Vlas SJ, Van De Vegte-Bolmer M, Bangs MJ, et al. Rapid onset of transmission-reducing antibodies in Javanese migrants exposed to malaria in Papua, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(3):425–31.
142. Drakeley CJ, Bousema JT, Akim NIJ, Teelen K, Roeffen W, Lensen AH, et al. Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunol*. 2006;28(5):185–90.
143. Bousema JT, Drakeley CJ, Kihonda J, Hendriks JCM, Akim NIJ, Roeffen W, et al. A longitudinal study of immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens in Tanzanian adults. *Parasite Immunol*. 2007;29(6):309–17.
144. Pratt-Riccio LR, Bianco-Junior C, Totino PRR, Perce-da-Silva D de S, Silva LA, Riccio EKP, et al. Antibodies against the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein from naturally exposed individuals living in a Brazilian malaria-endemic area can inhibit in vitro parasite growth. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:34–43.
145. Genton B. Malaria vaccines: a toy for travelers or a tool for eradication? *Vaccines*. 2008. 7(5), 597-611.
146. Vekemans J, Ballou WR. *Plasmodium falciparum* malaria vaccines in development. 2008. *Expert Review Vaccine*. Vol. 7.
147. Draper SJ, Sack BK, King CR, Nielsen CM, Rayner JC, Higgins MK, et al. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host & Microbe*. 2018. 24.
148. Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, Gässler M, Imoukhuede EB, Imbault N, et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2009 Nov;27(49):6862–8.
149. Schwartz L, Brown G V, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J*. 2012;11(1):11.
150. Reed ZH, Friede M, Kieny MP. Malaria vaccine development: progress and challenges. *Curr Mol Med*. 2006 Mar 1;6(2):231–45.
151. Osier FH, Mackinnon MJ, Crosnier C, Fegan G, Kamuyu G, Wanaguru M, et al. New antigens for a multicomponent blood-stage malaria vaccine. *Sci Transl Med*. 2014 Jul;6(247):247ra102.
152. Wickramarachchi T, Cabrera AL, Sinha D, Dhawan S, Chandran T, Devi YS, et al. A novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein associated with the merozoite surface, PfDBLMSP. *Int J Parasitol*. 2009 Jun;39(7):763–73.
153. Hodder AN, Czabotar PE, Uboldi AD, Clarke OB, Lin CS, Healer J, et al. Insights into Duffy binding-like domains through the crystal structure and function of the merozoite surface protein MSPDBL2 from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2012 Sep;287(39):32922–39.
154. Lin CS, Uboldi AD, Marapana D, Czabotar PE, Epp C, Bujard H, et al. The merozoite surface protein 1 complex is a platform for binding to human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2014 Sep. 289(37):25655–69.
155. Woehlbier U, Epp C, Kauth CW, Lutz R, Long CA, Coulbaly B, et al. Analysis of Antibodies Directed against Merozoite Surface Protein 1 of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*. 2006. Vol. 74, n° 2, p. 1313-1322.

156. Tetteh KKA, Osier FHA, Salanti A, Kamuyu G, Drought L, Faily M, et al. Analysis of Antibodies to Newly Described *Plasmodium falciparum* Merozoite Antigens Supports MSPDBL2 as a Predicted Target of Naturally Acquired Immunity. *Infection and Immunity*. 2013. Vol. 81. No.10: p. 3835–3842.
157. Chiu CYH, Hodder AN, Lin CS, Hill DL, Li Wai Suen CSN, Schofield L, et al. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* Proteins MSPDBL1 and MSPDBL2 Opsonize Merozoites, Inhibit Parasite Growth, and Predict Protection From Clinical Malaria. *J Infect Dis*. 2015; 212(3): 406–15.
158. Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. *Vaccine*. 2012 Mar;30(11):1972–80.
159. Van Tyne D, Park DJ, Schaffner SF, Neafsey DE, Angelino E, Cortese JF, et al. Identification and functional validation of the novel antimalarial resistance locus PF10_0355 in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Genet*. 2011 Apr;7(4):e1001383.
160. Amambua-Ngwa A, Tetteh KKA, Manske M, Gomez-Escobar N, Stewart LB, Deerhake ME, et al. Population genomic scan for candidate signatures of balancing selection to guide antigen characterization in malaria parasites. *PLoS Genet*. 2012;8(11):e1002992.
161. Weedall GD, Conway DJ. Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity. *Trends Parasitol*. 2010 Jul;26(7):363–9.
162. Matos AS, Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Baptista BO, de Souza RM, Chaves LB, et al. Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals from the Brazilian Amazon. *Front. Immunol*. 2019. Vol. 10. Art. 2230.
163. Wang K, Li H, Xu Y, Shao Q, Yi J, Wang R, et al. MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul;47(W1):W610–3.
164. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit*. 2008;21(4):243–55.
165. Gausepohl H, Boulin C, Kraft M, Frank R. Automated multiple peptide synthesis. *Pept Res*. 1992. 5: 315–20.
166. Conway DJ, Polley SD. Measuring immune selection. *Parasitology*. 2002; 125: S3-16.
167. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resumo Epidemiológico por Local de Notificação [Internet]. DataSUS. 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>
168. BRASIL. Instituto Oswaldo Cruz. Mestrado em Biologia Parasitária. Avaliação do polimorfismo genético da proteína de superfície do merozoíto de ligação ao Duffy 1 e proteína da superfície do merozoíto de ligação ao Duffy 2 (MSPDBL-1 e MSPDBL-2) de *Plasmodium falciparum* e o seu impacto nos epítomos de células b e t imunodominantes em áreas endêmicas brasileiras de malária. Juliana Aline de Souza Lemos. Agosto de 2021.
169. Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Healer J, Hodder AN, Fowkes FJI, et al. Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. *J Immunol*. 2013; 191(2): 795–809.
170. Pratt-Riccio LR, Lima JC, Carvalho LJM, Theisen M, Espíndola-Mendes EC, Santos F, et al. Antibody response profiles induced by *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein in naturally exposed individuals from a Brazilian area endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(6):1096–103.
171. Nebie I, Tiono AB, Diallo DA, Samandoulougou S, Diarra A, Konate AT, et al. Do antibody responses to malaria vaccine candidates influenced by the level of

- malaria transmission protect from malaria? Trop Med Int Heal. 2008 Feb 26;13(2):229–37.
172. Banic DM, Goldberg AC, Pratt-Riccio LR, De Oliveira-Ferreira J, Santos F, Gras-Masse H, et al. Human leukocyte antigen class II control of the immune response to p126-derived amino terminal peptide from *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 2002 May;66(5):509–15.
173. Sarr JB, Samb B, Sagna AB, Fortin S, Doucoure S, Sow C, et al. Differential acquisition of human antibody responses to *Plasmodium falciparum* according to intensity of exposure to *Anopheles* bites. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012 Aug;106(8):460–7.
174. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, et al. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. J Infect Dis. 1996 Mar;173(3):765–9.
175. Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, et al. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. Am J Trop Med Hyg. 1998 Feb;58(2):211–9.
176. Banic DM, De Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Conseil V, Gonçalves D, Fialho RR, et al. Immune response and lack of immune response to *Plasmodium falciparum* p126 antigen and its amino-terminal repeat in malaria-infected humans. Am J Trop Med Hyg. 1998 Jun;58(6):768–74.
177. Roussilhon C, Oeuvray C, Müller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape J-F, et al. Long-term clinical protection from *falciparum* malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. Krishna S, editor. PLoS Med. 2007 Nov 13;4(11):e320.
178. John CC, Tande AJ, Moormann AM, Sumba PO, Lanar DE, Min XM, et al. Antibodies to pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children. J Infect Dis. 2008 Feb 15;197(4):519–26.
179. Osier FHA, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KKA, et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. Infect Immun. 2008 May 1;76(5):2240–8.
180. Riley EM, Olerup O, Bennett S, Rowe P, Allen SJ, Blackman MJ, et al. MHC and malaria: the relationship between HLA class II alleles and immune responses to *Plasmodium falciparum*. Int Immunol. 1992;4(9):1055–63.
181. al-Yaman F, Genton B, Anders RF, Falk M, Triglia T, Lewis D, et al. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. Am J Trop Med Hyg. 1994 Nov;51(5):593–602.
182. de Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. Clin Infect Dis. 1995 Feb;20(2):475.
183. Mendonça VR, Souza LC, Garcia GC, Magalhães BM, Lacerda MV, Andrade BB, et al. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with clinical outcomes of patients with *Plasmodium vivax* malaria. Malar J. 2014 Jul 19;13(1):278.
184. Druilhe P, Khusmith S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. Infect Immun. 1987;55(4):888–91.

185. Marsh SGE, Bodmer JG. HLA-DR and -DQ epitopes and monoclonal antibody specificity. *Immunol Today*. 1989 Sep;10(9):305–12.
186. Balthazar-Guedes. Malaria diagnosis: identification of an anti-40-kDa polypeptide antibody response associated with active or recent infection and study of the IgG/IgM ratio of antibodies to blood-stage *Plasmodium falciparum* antigens. *Parasitol. Res.* 1995;81: 305-309.
187. Gonzales SJ, Reyes RA, Braddom AE, Batugedara G, Bol S, Bunnik EM. Naturally acquired humoral immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. *Frontiers in Immunology*. 2020. Vol. 11: art. 594653ste.
188. Matos AS, Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Baptista BO, de Souza RM, Chaves LB, et al. Antibody Responses Against Plasmodium vivax TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed 100 Individuals From the Brazilian Amazon. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. Art. 2230.
189. Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect Immun.* 2000;68(5):2617–20.
190. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Khin-Saw-Aye, Druilhe P. Association between Protection against Clinical Malaria and Antibodies to Merozoite Surface Antigens in an Area of Hyperendemicity in Myanmar: Complementarity between Responses to Merozoite Surface Protein 3 and the 220-Kilodalton Glutamate-Rich Protein. *Infect Immun.* 2004;72(1):247–52.
191. Lusingu JPA, Vestergaard LS, Alifrangis M, Mmbando BP, Theisen M, Kitua AY, et al. Cytophilic antibodies to *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein are associated with malaria protection in an area of holoendemic transmission. *Malar J.* 2005;4:48.
192. Groux H, Gysin J. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol.* 1990;141(6):529–42.
193. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87 Suppl 3:229–34.
194. Beck HP, Felger I, Genton B, Alexander N, Al-Yaman F, Anders RF, et al. Humoral and cell-mediated immunity to the *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen in an adult population exposed to highly endemic malaria. *Infect Immun.* 1995;63(2):596–600.
195. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med.* 1995;182(2):409–18.
196. Oeuvray BC, Bouharoun-tayoun H, Gras-masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, et al. Merozoite Surface Protein-3: A Malaria Protein Inducing Antibodies That Promote. *Blood.* 1994;84(5):1594–603.
197. Metzger WG, Okenu DMN, Cavanagh DR, Robinson J V., Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol.* 2003 Jun 1;25(6):307–12.
198. Hogh B, Marbiah NT, Petersen E, Dolopaye E, Willcox M, Björkman A, et al. Classification of clinical *falciparum* malaria and its use for the evaluation of chemosuppression in children under six years of age in Liberia, West Africa. *Acta Trop.* 1993 Aug;54(2):105–15.
199. Maya DW, Mavoungou E, Deloron P, Theisen M, Ntoumi F. Distribution of IgG subclass antibodies specific for *Plasmodium falciparum* glutamate-rich-protein

molecule in sickle cell trait children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol.* 2006 Feb;112(2):92–8.

200. Baptista BO, de Souza ABL, Riccio EKP, Bianco-Junior C, Totino PRR, da Silva JHM, *et al.* Naturally acquired antibody response to a *Plasmodium falciparum* chimeric vaccine candidate GMZ2.6c and its components (MSP-3, GLURP, and Pfs48/45) in individuals living in Brazilian malaria-endemic areas. *Malaria Journal.* 2022. 21:6.

201. Smythe JA, Peterson MG, Coppel RL, Saul AJ, Kemp DJ, Anders RF. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990 Mar;39(2):227–34.

202. Bolad A, Berzins K. Antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* and antibody-mediated parasite neutralization. *Scand J Immunol.* 2000 Sep;52(3):233–9.

203. Lin L-Y, Huang H-Y, Liang X-Y, Xie D-D, Chen J-T, Wei H-G, *et al.* Genetic diversity and natural selection on the thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) gene of *Plasmodium falciparum* on Bioko Island, Equatorial Guinea and global comparative analysis. *Malar J.* 2021 Mar;20(1):124

9 ANEXOS

ANEXO I – PARECER COMITE DE ETICA



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: L420.846

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

Critério de Inclusão:

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

Critério de Exclusão:

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

Plano amostral:

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

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

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

Centros Coparticipantes:

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

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

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pf48/45 em indivíduos cronicamente expostos à malária residentes em áreas

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-6011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

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

Objetivo Secundário:

- Avaliar o perfil das respostas imunes celular (populações linfocitárias, resposta proliferativa, perfil de produção de citocinas) e humoral (IgG e subclasses, IgM, IgE e IgA) contra a candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em indivíduos cronicamente expostos à malária residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira com alto e médio risco de transmissão;
- Avaliar a relevância das proteínas MSP-3, GLURP e Pfs48/45 no processo de aquisição de uma imunidade antiparasitária pela análise do perfil das respostas imunes humoral e celular e pelos dados clínicos e epidemiológicos;
- Estudar o efeito *in vitro* de anticorpos anti-GMZ2.6c sobre o crescimento de *P. falciparum* verificando uma possível participação no mecanismo de ADCl;
- Avaliar a extensão do polimorfismo genético dos antígenos MSP-3, GLURP e Pfs48/45 e seu papel no desenvolvimento de uma resposta imune específica;
- Estudar a relação entre os Antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II e a resposta imune contra a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 706 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: capfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.420.846

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

1) PROJETO:

a) Delineamento do estudo:

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

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

Pendência atendida.

b) Metodologia:

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

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

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3852-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

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

Pendência atendida.

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

Pendência atendida.

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

Pendência atendida.

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

Pendência atendida.

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

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

Continuação do Parecer: 1.420.846

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

Pendência atendida.

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

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

Pendência atendida.

c) Dos riscos e benefícios

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

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

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

Pendência atendida.

2 e 3) TCLE e TALE.

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

Pendência atendida.

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

Continuação do Parecer: 1.430.848

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

Pendência atendida.

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

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

Pendência atendida.

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

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

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

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

Pendência atendida.

5) DECLARAÇÃO DAS INSTITUIÇÕES

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

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

Continuação do Parecer: 1.432.846

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

As declarações foram incluídas.

Pendência atendida.

7) ACORDO ENTRE AS INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

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

Os acordos entre as instituições foram reescritos e anexados.

Pendência atendida.

8) DECLARAÇÃO

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

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

Pendência atendida.

9) CRONOGRAMA

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

O cronograma foi corrigido.

Pendência atendida.

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

Continuação do Parecer: 1.420.846

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto Folha de Rosto.pdf

TCLE / Termos de Assentimento / ANEXOIIIITALE.docx

TCLE / Termos de Assentimento / ANEXOIIITCLEcontroles.docx

TCLE / Termos de Assentimento/ ANEXOITCLEmalaria.docx

Carta resposta.docx

ANEXOVI quest.docx

ANEXOIV deccoord.docx

BIORREPOSITORIO.docx

Orçamento Orcamento.docx

Declaração de Instituição e Infraestrutura AnuencialUSP.pdf

Declaração de Pesquisadores CartaMarcusLacerda_Lilian.pdf

Declaração de Pesquisadores AcordoMVGL.pdf

Declaração de Pesquisadores DeclaracaoMUF.pdf

Declaração de Pesquisadores ACORDOMUF.pdf

Declaração de Pesquisadores AcordoRLDM.pdf

Declaração de Pesquisadores AnuencialFMTAM.pdf

Declaração de Pesquisadores DeccompMVGL.pdf

Declaração de Pesquisadores DeccompRLDM.pdf

Projeto Detalhado /Brochura Investigador PROJETO.doc

Recomendações:

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

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Continuação do Parecer: 1.430.846

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

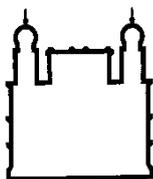
Não

RIO DE JANEIRO, 23 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 706 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: ospfocruz@ioc.fiocruz.br

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



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



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – MALÁRIA

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC

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

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

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em populações naturalmente imunizadas por exposição crônica residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária.

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Os dados e todas as informações dadas por você estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/Fiocruz do Ministério da Saúde. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e o acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelos pesquisadores envolvidos no projeto. A sua participação é

inteiramente voluntária e você é livre para recusar a participar, assim como para desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para seu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

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

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

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

_____ Data: _____

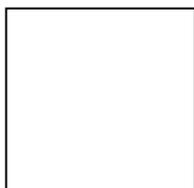
Assinatura do Pesquisador

_____ Data: _____

Assinatura Testemunha

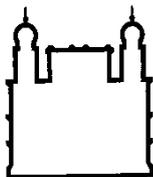
_____ Data: _____

Assinatura do voluntário



Em caso de
analfabetismo ou
impossibilidade de assinar,

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



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



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC

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

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

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em populações naturalmente imunizadas por exposição crônica residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária.

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

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

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

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

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

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

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

Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (“rouxidão”) no local da punção, com duração de 3 a 4 dias. Todos os cuidados apropriados serão tomados,

como o uso de seringa, agulha e gaze descartável assim como álcool para assepsia local, entre outros.

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

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

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

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

Eu, _____ fui informado sobre o projeto de maneira clara e tendo o consentimento já assinado pelo

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

_____ Data: _____

Assinatura do Pesquisador

_____ Data: _____

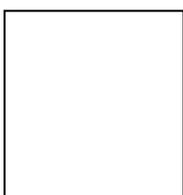
Assinatura Testemunha

_____ Data: _____

Assinatura Responsável

_____ Data: _____

Assinatura do menor voluntário

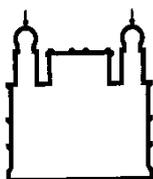


Em caso de
impossibilidade de o
responsável assinar inserir



Em caso de
impossibilidade de o menor
assinar inserir impressão digital

ANEXO IV - QUESTIONÁRIO



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



REGISTRO Nº	Data:
--------------------	--------------

PROJETO: Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em populações naturalmente imunizadas por exposição crônica residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária.

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

EXPOSIÇÃO A INFECÇÃO MALÁRICA

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

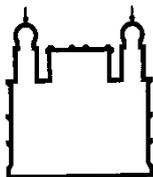
INFECÇÃO ATUAL

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

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

<input type="checkbox"/> GOTA ESPESSA <input type="checkbox"/> DISTENSÃO SANGUÍNEA <input type="checkbox"/> SANGUE
--

ANEXO V - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE



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



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

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC

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

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

Título Oficial do Projeto Pesquisa: Avaliação do potencial antigênico da candidata a vacina antimalárica GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em populações naturalmente imunizadas por exposição crônica residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária.

Investigador Principal: Lilian Rose Pratt Riccio

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

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

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

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

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

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

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

Benefícios esperados: Os resultados desse estudo não o beneficiarão diretamente, mas poderão, no futuro, beneficiar outras pessoas. O estudo da resposta

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

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

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

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

experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados.

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

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

_____ Data: _____

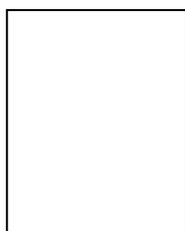
Assinatura do Pesquisador

_____ Data: _____

Assinatura Testemunha

_____ Data: _____

Assinatura do Voluntário



Em caso de
analfabetismo ou
impossibilidade de assinar

