

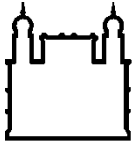
**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Perfil da resposta imune humoral e celular contra a proteína recombinante GMZ2.6c de *Plasmodium falciparum* e a influência do polimorfismo genético do parasito na modulação da resposta imune específica**

**BARBARA DE OLIVEIRA BAPTISTA**

**Rio de Janeiro  
Janeiro de 2023**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

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

*BARBARA DE OLIVEIRA BAPTISTA*

Perfil da resposta imune humoral e celular contra a proteína recombinante GMZ2.6c de *Plasmodium falciparum* e a influência do polimorfismo genético do parasito na modulação da resposta imune específica

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

**Orientadora:** Dra. Lilian Rose Pratt Riccio

**RIO DE JANEIRO**  
Janeiro de 2023

de Oliveira Baptista, Barbara.

Perfil da resposta imune humoral e celular contra a proteína recombinante GMZ2.6c de *Plasmodium falciparum* e a influência do polimorfismo genético do parasito na modulação da resposta imune específica / Barbara de Oliveira Baptista. - Rio de Janeiro, 2023.

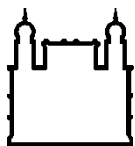
296 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2023.

Orientadora: Lilian Rose Pratt-Riccio.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Malária. 2. *Plasmodium falciparum*. 3. GMZ2.6c. 4. Resposta imune. 5. Diversidade genética. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**BARBARA DE OLIVEIRA BAPTISTA**

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE GMZ2.6C DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* E A INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO PARASITO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA**

**ORIENTADORA: Dra. Lilian Rose Pratt Riccio**

**Aprovada em: 26/01/2023**

### **EXAMINADORES:**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

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

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciane Moreno Storti de Melo** (Universidade Federal de Sergipe/UFS)

**Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva** (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ)

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Mello de Luca** (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 26 de Janeiro de 2023



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de **Barbara de Oliveira Baptista**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Lilian Rose Pratt Riccio. Ao vigésimo sexto dia do mês de janeiro de dois mil e vinte e três, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: “**Perfil de resposta imune humoral e celular contra a proteína recombinante GMZ2.6c de Plasmodium falciparum e a influência de polimorfismo genético do parasito na modulação da resposta imune**”, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Genética de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Joseli de Oliveira Ferreira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado – UFF/RJ, Dr<sup>a</sup>. Luciane Moreno Stort de Melo – UFSE/SE, e como suplentes: Dr. Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva - BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Paula Mello de Luca - 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 tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós- Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora 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 os 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, 26 de janeiro de 2023.

Dr<sup>a</sup>. Joseli de Oliveira Ferreira (Presidente da Banca):

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

À *Deus*, que me presenteia todos os dias com a força e coragem para seguir em frente, por me proteger e manter saudável, mesmo nos momentos tão difíceis que passamos durante a pandemia de COVID-19!

A minha família, especialmente, à minha avó *Sônia Maria de Oliveira Baptista (in memoriam)*, que me criou, educou e esteve sempre ao meu lado. Sem seus ensinamentos eu nunca me tornaria quem sou hoje!

## AGRADECIMENTOS

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

À *Dr<sup>a</sup>. Lilian Rose Pratt Riccio* pela orientação, estímulo, oportunidades, dedicação, conhecimento, apoio e pela força que me concedeu em todos os momentos que precisei, além da confiança depositada em mim durante todo tempo que trabalhamos juntas. Obrigada também pela amizade, carinho, conselhos e compreensão, não se tornando apenas minha orientadora, mas também uma grande amiga. Você teve um papel fundamental na realização deste trabalho, assim como no meu crescimento pessoal e profissional. Não consigo encontrar palavras para expressar o tamanho da admiração e respeito que tenho por você!

Ao *Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro* por me receber tão gentilmente em seu laboratório e por todo o seu apoio durante esses anos.

À *Dr<sup>a</sup>. Evelyn Kety Pratt Riccio* e *Dr. Paulo Renato Rivas Totino* pela amizade, apoio e colaboração, dando dicas valiosas para a realização desse trabalho.

Às alunas de iniciação científica, *Ana Beatriz Lopes de Souza* e *Micaela da Silva Cardoso*, pela dedicação, amizade e excelente ajuda nos ELISAS. E aos MSc. *Jenifer Peixoto de Barros*, MSc. *Juliana Aline de Souza Lemos* e *Lucas Tavares de Queiroz* pela convivência, companheirismo e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos membros da equipe de trabalho de campo *Dr<sup>a</sup>. Lilian Rose Pratt Riccio*, *Dr<sup>a</sup>. Evelyn Kety Pratt Riccio*, *Dr. Josué da Costa Lima Junior*, *Dr. Paulo Renato Rivas Totino*, MSc. *Hugo Amorim dos Santos de Souza*, MSc. *Jenifer Peixoto de Barros* e *Ana Beatriz Lopes de Souza* pelo apoio durante os 40 dias de intenso e divertido trabalho na primeira e/ou segunda coleta.

Ao *Dr. Rodrigo Medeiros* pela colaboração, permitindo e facilitando a realização dos trabalhos em seu laboratório na Universidade Federal do Acre (UFAC), em Cruzeiro do Sul.

Ao Dr. *Michael Theisen* pela importante colaboração e pelas proteínas recombinantes.

Ao Dr. *Josué da Costa Lima Junior* e MSc. *Isabela Ferreira Soares* pelas valiosas discussões e auxílio nos ensaios de ELISpot e Dr<sup>a</sup>. *Lana Bitencourt Chaves* pelas análises de genética intrapopulacional.

Ao Dr. *Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva* pela colaboração e auxílio na predição de epítomos de células B e T.

Ao amigo *Cesare Bianco Junior* por todo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho, principalmente na purificação dos anticorpos.

Ao Dr. *Dave Richard* por me acolher e permitir que eu desenvolvesse parte desse trabalho em seu laboratório no *Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Quebec – CHUL – Université Laval*. E aos MSc. *Dominic Gagnon* e *Audrey Sergerie* pela ajuda na padronização dos ensaios de fagocitose. Agradeço a todos pela receptividade e disponibilidade para me auxiliar na realização dos experimentos e com a língua francesa. *Merci!*

Às amigas do PrInt, *Agatha Charnobay*, *Fernanda Albuini*, *Luna Vargas* e *Paloma Libório*, por não me deixarem pirar em Quebec, a companhia de vocês foi fundamental na minha estadia na cidade.

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

Ao *Hélio Cameli*, *Muana*, *Nielson*, *Melo* e *Francisco*, da Coordenação de Endemias de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará, e toda a sua equipe de agentes de saúde pela permissão e apoio indispensável para a realização do trabalho de campo nesses locais.



À *Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)*, *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* e *Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)*, por terem financiado essa parte de minha formação.

À *Plataforma de multiusuários de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica*, do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Em especial, à *Dr<sup>a</sup>. Cynthia Machado Cascabulho* pelas valiosas dicas durante a aquisição das amostras no citometro.

À *Dr<sup>a</sup>. Joseli de Oliveira Ferreira*, por aceitar o convite para ser revisora e membro da banca dessa tese.

Aos Doutores *Ricardo Luiz Dantas Machado*, *Luciane Moreno Storti de Melo*, *Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva* e *Paula Mello de Luca* por terem aceitado gentilmente o convite para participar da banca dessa tese.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, *Dr. Rafael Maciel de Freitas* e *Dr. André Roque*, pela ajuda com questões burocráticas, principalmente pelo estímulo para realização do Doutorado Sanduíche, mesmo depois de todas as dificuldades devido à pandemia de COVID-19 e ao prazo apertado para defesa de doutorado. Aos *professores*, pelos conhecimentos adquiridos e pelas valiosas discussões. E a secretária, *Rita Gomes*, por estar sempre disposta a ajudar e resolver nossos problemas de maneira rápida e prática.

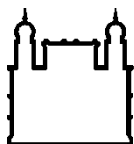
Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Malária, *Aline Lavigne*, *Aline Moreira*, *Ana Beatriz Lopes*, *Ana Beatriz Rodrigues*, *Beatriz Nogueira*, *Carina Heusner*, *Carolina Blanco*, *Caroline Gress*, *Cesare Bianco*, *Cláudia Castro*, *Cláudio Ribeiro*, *Daiana Perce*, *Fátima Cruz*, *Fabiana Gomes*, *Flávia Gomes*, *Guilherme Salgado*, *Hugo Souza*, *Jenifer Peixoto*, *Júlia Goulart*, *Juliana Lemos*, *Kamilla Rogério*, *Leonardo Carvalho*, *Lilian Riccio*, *Luana Santos*, *Lucas Freire*, *Lucas Tavares*, *Luciana Souza*, *Marcos Rangel*, *Micaela Cardoso*, *Mônica Almeida*, *Natália Oliveira*, *Paulo Totino*, *Pamela Rosa*, *Priscilla Martins*, *Rebecca Abreu*, *Saba Gul*, *Saiqa Sardar* e *Uyla Ornellas*, pela amizade, apoio, paciência e carinho, indispensáveis para a realização desse trabalho.

À amiga *Alinne Renzetti*, parceira da Universidade até o Doutorado, mesmo em laboratórios diferentes estava sempre presente, principalmente nas fofocas do almoço. Aos amigos *Carolina Blanco*, *Jéssica Waterman*, *Juliana Lemos* e *Hugo Souza*, presentes que o Laboratório de Pesquisa em Malária me deu, meus grandes parceiros nesses últimos anos, seja em congressos, trabalhos de campo, doutorado sanduíche, cafezinhos e/ou cervejinhas.

A todos que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram não apenas para o desenvolvimento desse trabalho, fornecendo dados ou sanando dúvidas, mas que diariamente estão presentes na minha vida de alguma maneira e que seus atos e palavras construtivas me ajudaram a conquistar minhas metas e objetivos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

**(José de Alencar)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

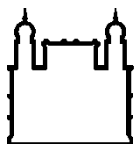
### PERFIL DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE GMZ2.6C DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* E A INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO PARASITO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Barbara de Oliveira Baptista

A GMZ2.6c é uma proteína quimérica candidata a uma vacina multiestágio contra *Plasmodium falciparum* composta de um fragmento da proteína de estágio sexuado *Pfs48/45-6C* geneticamente fusionado a GMZ2, uma proteína quimérica contendo GLURP e MSP-3. A GMZ2 demonstrou ser bem tolerada, segura e imunogênica em ensaios clínicos realizados em áreas endêmicas de malária na África. Contudo, não há dados disponíveis sobre a antigenicidade ou imunogenicidade da GMZ2.6c em humanos. Considerando que parasitos circulantes podem ser geneticamente distintos em diferentes áreas endêmicas de malária e que fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar a resposta imunológica contra antígenos vacinais, é importante a realização de estudos imunogenéticos que possam contribuir para um melhor entendimento da resposta imune naturalmente adquirida para antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica. Nesse trabalho, foram avaliados o perfil das respostas imune humoral e celular contra a GMZ2.6c e seus componentes (GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45*) e a influência do polimorfismo genético do parasito no desenvolvimento da resposta imune específica. O estudo foi realizado em três municípios da Amazônia Brasileira: Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima, no estado do Acre, e Guajará, no estado do Amazonas. A pesquisa de anticorpos contra a GMZ2.6c, seus fragmentos individuais e seus epítomos de células B foi realizada pela técnica de ELISA. As subpopulações linfocitárias foram avaliadas por citometria de fluxo *ex vivo* e após o estímulo com cada uma das proteínas recombinantes. O número relativo de células T específicas secretoras de IFN- $\gamma$  contra epítomos de célula T foi realizado através da técnica de ELISpot. A avaliação do polimorfismo genético das proteínas GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45* foi realizado por PCR e sequenciamento. Os resultados mostraram que a proteína GMZ2.6c foi amplamente reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos de indivíduos de áreas endêmicas com diferentes níveis de transmissão. A prevalência de indivíduos com anticorpos para a GMZ2.6c foi maior quando comparada aos seus fragmentos individuais provavelmente devido a um efeito aditivo da GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45* quando inseridos na mesma construção. Indivíduos naturalmente expostos a malária possuíam, predominantemente, anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 anti-GMZ2.6c, fato importante considerando que na imunidade protetora contra a malária há um balanço entre anticorpos citofílicos/não citofílicos. Os anticorpos anti-GMZ2.6c parecem aumentar com a exposição à infecção e podem contribuir para a imunidade parasitária. Nos indivíduos infectados com *P. falciparum*, o maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi observado com os estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45* e linfócitos T CD8<sup>+</sup> com GLURP. É provável que a expansão dessas células seja em decorrência da infecção malárica aguda, contudo a resposta de linfócitos B foi limitada. Identificamos múltiplos epítomos de células B e T derivados da GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45* amplamente reconhecidos por anticorpos e células T de indivíduos residentes nas áreas endêmicas estudadas. A avaliação do polimorfismo genético mostrou um limitado número de polimorfismos na região R0 da GLURP, relativa conservação na região C-terminal da MSP-3 e, alta conservação na região 6c da *Pfs48/45*. Os polimorfismos encontrados nos isolados estudados não impactaram significativamente nos epítomos de célula B e T. Em conjunto, nossos dados realçam a importância da GMZ2.6c como uma candidata a vacina multiestágio.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSE PROFILE AGAINST THE RECOMBINANT PROTEIN GMZ2.6C OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* AND THE INFLUENCE OF PARASITE GENETIC POLYMORPHISM ON THE MODULATION OF THE SPECIFIC IMMUNE RESPONSE

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN PARASITARY BIOLOGY

**Barbara de Oliveira Baptista**

The GMZ2.6c malaria vaccine candidate is a multi-stage *Plasmodium falciparum* chimeric protein which contains a fragment of the sexual-stage Pfs48/45-6C protein genetically fused to GMZ2, a fusion protein of GLURP and MSP-3. The GMZ2 has been shown to be well tolerated, safe and immunogenic in clinical trials performed in a malaria endemic area of Africa. However, there is no data available on the antigenicity or immunogenicity of GMZ2.6c in humans. Considering that circulating parasites can be genetically distinct in different malaria endemic areas and that host genetic factors can influence the immune response against vaccine antigens, it is important to perform immunogenetic studies that may contribute to a better understanding of the naturally acquired immune response to candidate antigens for an antimalarial vaccine. In this work, the profile of humoral and cellular immune responses against GMZ2.6c and its components (GLURP, MSP-3, and Pfs48/45) and the influence of parasite genetic polymorphisms on the development of the specific immune response were evaluated. The study was carried out in three municipalities in the Brazilian Amazon: Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima, Acre state, and Guajará, Amazonas state. The antibody response against GMZ2.6c, its individual fragments, and its B-cell epitopes was performed by ELISA. Lymphocyte subpopulations were evaluated by flow cytometry *ex vivo* and after stimulation with each of the recombinant proteins. The relative number of specific IFN- $\gamma$ -secreting T cells against T cell epitopes was performed by ELISpot. The genetic polymorphism of GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 was evaluated by PCR and sequencing. The results showed that GMZ2.6c protein was widely recognized by naturally acquired antibodies from individuals of the Brazilian endemic areas with different levels of transmission. The prevalence of individuals with antibodies against GMZ2.6c was higher when compared to its individual components probably due to an additive effect of GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 when inserted in the same construct. Naturally malaria-exposed individuals predominantly had IgG1 and IgG3 cytophilic anti-GMZ2.6c antibodies, an important fact considering that the acquisition of anti-malaria protective immunity results from a delicate balance between cytophilic/non-cytophilic antibodies. Anti-GMZ2.6c antibodies seem to increase with exposure to infection and may contribute to parasite immunity. The higher percentage of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes stimulated with GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 and Pfs48/45 and, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes with GLURP in individuals parasitized by *P. falciparum* suggest an expansion of these cells due to malarial infection, but the B lymphocytes response was limited. We identified multiple T and B cell epitopes derived from GLURP, MSP-3 and Pfs48/45 widely recognized by antibodies and T cells from residents of the studied endemic areas. Evaluation of genetic polymorphism showed a limited number of polymorphisms in the R0 region of GLURP, relative conservation in the C-terminal region of MSP-3, and high conservation in the 6c region of Pfs48/45. The polymorphisms found in the studied isolates did not significantly impact the B and T cell epitopes. Taken together, our data highlight the importance of GMZ2.6c as a multistage vaccine candidate.

# ÍNDICE

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Malária: Aspectos gerais.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2. Ciclo biológico do <i>Plasmodium spp.</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3. Resposta imune antimalárica .....</b>	<b>31</b>
1.3.1. Resposta imune contra o estágio pré-eritrocítico.....	34
1.3.2. Resposta imune contra o estágio eritrocítico .....	35
<b>1.4. A busca por uma vacina antimalárica.....</b>	<b>37</b>
<b>1.5. A proteína recombinante GMZ2.6c .....</b>	<b>43</b>
1.5.1. Proteína Rica em Glutamato (GLURP).....	44
1.5.2. Proteína 3 de Superfície do Merozoíto (MSP-3).....	45
1.5.3. Proteína 48/45 de Superfície de Gametócito (s48/45) .....	47
<b>1.6. Justificativa .....</b>	<b>48</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>50</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Artigo 1 - Naturally acquired antibody response to a <i>Plasmodium falciparum</i> chimeric vaccine candidate GMZ2.6c and its components (MSP-3, GLURP, and PFS48/45) in individuals living in Brazilian malaria-endemic areas.....</b>	<b>51</b>

<b>3.2. Artigo 2 – B-cell epitope mapping of the <i>Plasmodium falciparum</i> malaria vaccine candidate GMZ2.6c in naturally exposed population of the Brazilian Amazon.....</b>	<b>69</b>
<b>3.3. Resultados complementares.....</b>	<b>87</b>
3.3.1. Ensaio de Imunofluorescência .....	87
3.3.2. Avaliação da resposta imune celular contra a proteína GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45). .....	89
3.3.2.1. Imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias.....	90
3.3.2.1.1. Características da população estudada.....	91
3.3.2.1.2. Avaliação da viabilidade celular <i>ex vivo</i> e após cultivo de 96h.....	92
3.3.2.1.3. Avaliação das populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> e B.....	94
3.3.2.1.4. Avaliação da ativação celular <i>ex vivo</i> e após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina.....	97
3.3.2.1.5. Caracterização funcional das populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> <i>ex vivo</i> .....	99
3.3.2.1.6. Caracterização funcional das populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina.....	102
3.3.2.2. Identificação e validação de epítomos de célula T da GMZ2.6c.....	107
3.3.3. Avaliação da diversidade genética dos genes que codificam as proteínas PfGLURP, PfMSP-3 e Pfs48/45 e seu impacto nos epítomos de células B e T .....	111
3.3.3.1. Amplificação dos segmentos gênicos de PfGLURP <sub>79-1500</sub> , PfMSP-3 <sub>463-747</sub> e Pfs48/45 <sub>859-1284</sub> .....	114
3.3.3.2. Análise do polimorfismo genético da PfGLURP.....	115
3.3.3.3. Análise do polimorfismo genético da PfMSP-3.....	118
3.3.3.4. Análise do polimorfismo genético da Pfs48/45.....	118
3.3.3.5. Diversidade genética encontrada na população estudada.....	119
3.3.3.6. Análise genética intrapopulacional.....	122

3.3.3.7.Substituição de aminoácidos de PfGLURP e PfMSP-3 nos isolados brasileiros.....	124
3.3.3.8.Modelagem molecular e impacto dos polimorfismos nos potenciais epítomos de células B e T.....	127
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>129</b>
<b>5. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>149</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>150</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>152</b>
<b>8. APÊNDICES E/OU ANEXOS.....</b>	<b>181</b>
<b>Anexo I – Parecer do Comitê de Ética .....</b>	<b>181</b>
<b>Anexo II – Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE) – Malária.....</b>	<b>193</b>
<b>Anexo III – Termo de Assentimento livre e esclarecido (TALE).....</b>	<b>196</b>
<b>Anexo IV - Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE) – Controle.....</b>	<b>199</b>
<b>Anexo V - Questionário.....</b>	<b>202</b>
<b>Anexo VI – Alinhamento da sequência referência 3D7 com as sequências obtidas no estudo.....</b>	<b>204</b>
<b>Anexo VII – Alinhamento da sequência de AA da referência 3D7 com as sequências obtidas no estudo.....</b>	<b>218</b>
<b>Anexo VIII – Coautoria em artigo .....</b>	<b>224</b>
<b>Anexo IX – Coautoria em artigo .....</b>	<b>234</b>
<b>Anexo X – Coautoria em artigo .....</b>	<b>243</b>
<b>Anexo XI – Coautoria em artigo .....</b>	<b>256</b>



<b>Anexo XII – Coautoria em artigo .....</b>	<b>271</b>
<b>Anexo XIII – Coautoria em artigo .....</b>	<b>290</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição global da malária, 2021.....	<b>26</b>
<b>Figura 2:</b> Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2021.....	<b>27</b>
<b>Figura 3:</b> Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> spp.....	<b>31</b>
<b>Figura 4:</b> Resposta imune antimalárica.....	<b>34</b>
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática de mecanismos mediados por anticorpos na imunidade contra as formas eritrocíticas do <i>P. falciparum</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática da PfGLURP, PfMSP-3, Pfs48/45 e da proteína híbrida GMZ2.6c.....	<b>43</b>
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática da Proteína GLURP de <i>P. falciparum</i> , mostrando as regiões N-terminal (R0), central (R1) e C-terminal (R2).....	<b>45</b>
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática da Proteína MSP-3 de <i>P. falciparum</i> , mostrando a região C-terminal e os peptídeos LR55 e MSP3b.....	<b>46</b>
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática da Proteína Pfs48/45 de <i>P. falciparum</i> , mostrando os domínios I (contendo o epítipo V), II (contendo os epítipos II e III) e III (contendo o epítipo I), evidenciando o fragmento 6c.....	<b>47</b>
<b>Figura 10:</b> Anticorpos anti-GLURP e anti-MSP-3 são capazes de reconhecer a proteína nativa do parasito.....	<b>89</b>
<b>Figura 11:</b> Representação gráfica da estratégia utilizada para quantificar o percentual de linfócitos viáveis (7-AAD <sup>-</sup> Anexina V <sup>-</sup> ) após cultura de 96h na ausência ou presença de diferentes estímulos.....	<b>93</b>
<b>Figura 12:</b> Avaliação da viabilidade celular após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina.....	<b>93</b>
<b>Figura 13:</b> Representação gráfica das estratégias de <i>gates</i> utilizadas para a quantificação do percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), CD8 <sup>+</sup> (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ) e B (CD19 <sup>+</sup> ) <i>ex vivo</i> (A) e após cultura de 96h na ausência ou presença de diferentes estímulos (B).....	<b>94</b>
<b>Figura 14:</b> Avaliação das populações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> e B após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina.....	<b>96</b>
<b>Figura 15:</b> Representação gráfica das estratégias de <i>gates</i> utilizadas para a quantificação do percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> ), CD8 <sup>+</sup> (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> ) e B (CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> ) ativados.....	<b>97</b>

<b>Figura 16:</b> Representação gráfica das estratégias de <i>gates</i> utilizadas para a quantificação do percentual das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> <i>naive</i> (CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> ), em transição <i>naive</i> /memória (CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> ) e de memória (CD45RA <sup>-</sup> CD45RO <sup>+</sup> ), assim como as subpopulações de linfócitos T de memória central (CD45RO <sup>+</sup> CD197 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> ) e efetora (CD45RO <sup>+</sup> CD197 <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> )... <b>99</b>
<b>Figura 17:</b> Subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> <i>naive</i> , em transição <i>naive</i> /memória e de memória nos grupos EXP e <i>PF ex vivo</i> ..... <b>100</b>
<b>Figura 18:</b> Subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> de memória central e efetora nos grupos EXP e <i>PF ex vivo</i> ..... <b>101</b>
<b>Figura 19:</b> Subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> <i>naive</i> , em transição <i>naive</i> /memória e de memória nos grupos EXP e <i>PF</i> após cultivo de 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina..... <b>103</b>
<b>Figura 20:</b> Subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> de memória central e efetora nos grupos EXP e <i>PF</i> após cultivo de 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina..... <b>104</b>
<b>Figura 21:</b> Subpopulações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> <i>naive</i> , em transição <i>naive</i> /memória e de memória nos grupos EXP e <i>PF</i> após cultivo de 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina..... <b>105</b>
<b>Figura 22:</b> Subpopulações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de memória central e efetora nos grupos EXP e <i>PF</i> após cultivo de 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina..... <b>106</b>
<b>Figura 23:</b> Frequência de indivíduos respondedores para os <i>pools</i> de peptídeos Mpp I, Ppp I, Ppp II e Gpp I nos grupos EXP e <i>PF</i> ..... <b>109</b>
<b>Figura 24:</b> Imagens representativas dos poços das placas de ELISpot mostrando a produção de IFN- $\gamma$ após estimulação com os <i>pools</i> de peptídeos Mpp I, Ppp I, Ppp II e Gpp I, além dos poços não estimulados (Branco) e Controle positivo (Anti-CD3)..... <b>110</b>
<b>Figura 25:</b> Amplificação por PCR da região R0 do gene <i>PfGLURP</i> ..... <b>114</b>
<b>Figura 26:</b> Amplificação por PCR da região C-terminal do gene <i>PfMSP-3</i> ..... <b>115</b>
<b>Figura 27:</b> Amplificação por PCR da região 6c do gene <i>Pfs48/45</i> ..... <b>115</b>
<b>Figura 28:</b> Estrutura de modelagem e análise <i>in silico</i> de epítomos da GMZ2.6c... <b>128</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais candidatas a vacina antimalária em ensaios clínicos ativos.....	<b>40</b>
<b>Tabela 2:</b> Características pessoais e epidemiológicas dos grupos EXP e PF para a avaliação da resposta imune celular contra as proteínas recombinantes GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45.....	<b>92</b>
<b>Tabela 3:</b> Frequências de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> e B <i>ex vivo</i> dos indivíduos dos grupos EXP e PF.....	<b>95</b>
<b>Tabela 4:</b> Ativação celular dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> e B de indivíduos dos grupos EXP e PF <i>ex vivo</i> e após 96h de cultura na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina.....	<b>98</b>
<b>Tabela 5:</b> Peptídeos usados no ensaio de ELISpot.....	<b>107</b>
<b>Tabela 6:</b> Características pessoais e epidemiológicas dos grupos EXP e PF para o mapeamento de epítomos de células T da GMZ2.6c.....	<b>109</b>
<b>Tabela 7:</b> Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes <i>Pf</i> GLURP, <i>Pf</i> MSP-3 e <i>Pfs</i> 48/45.....	<b>111</b>
<b>Tabela 8:</b> Condições de ciclagem para amplificação dos genes <i>Pf</i> GLURP, <i>Pf</i> MSP-3 e <i>Pfs</i> 48/45.....	<b>112</b>
<b>Tabela 9:</b> Polimorfismos encontrados no gene que codifica a região R0 da <i>Pf</i> GLURP: posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos.....	<b>117</b>
<b>Tabela 10:</b> Polimorfismos encontrados no gene que codifica a região C-terminal da <i>Pf</i> MSP-3: posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos.....	<b>118</b>
<b>Tabela 11:</b> Variantes da <i>Pf</i> GLURP e suas frequências na população estudada.....	<b>120</b>
<b>Tabela 12:</b> Variantes da <i>Pf</i> MSP-3 e suas frequências na população estudada.....	<b>122</b>
<b>Tabela 13:</b> Diversidade genética intrapopulacional do gene <i>Pf</i> GLURP em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará.....	<b>123</b>
<b>Tabela 14:</b> Diversidade genética intrapopulacional do gene <i>Pf</i> MSP-3 em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará.....	<b>124</b>

<b>Tabela 15:</b> Sítios de aminoácidos polimórficos da região R0 da <i>PfGLURP</i> presentes no Brasil e em outras regiões do mundo.....	<b>125</b>
<b>Tabela 16:</b> Sítios de aminoácidos polimórficos da região C-terminal da <i>PfMSP-3</i> presentes no Brasil e em outras regiões do mundo.....	<b>126</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
ACTs	<i>Artemisinin-based Combination Therapies</i> (Terapias Combinadas à base de Artemisinina)
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> (Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo)
ADCI	<i>Antibody-Dependent Cellular Inhibition</i> (Inibição Celular Dependente de Anticorpos)
ADRB	<i>Antibody-Dependent Respiratory Burst</i> (Explosão Respiratória Dependente de Anticorpos)
AMA-1	<i>Apical Membrane Antigen-1</i> (Antígeno 1 de Membrana Apical)
An	<i>Anopheles</i>
APCs	<i>Antigen-presenting cells</i> (células apresentadoras de antígeno)
BCR	<i>B cell receptor</i> (Receptor de células B)
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina de Soro Bovina)
°C	Grau Celsius
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
CellTOS	<i>Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites</i> (Proteína de travessia celular de oocinetos e esporozoítos)
CSP	<i>Circumsporozoite Protein</i> (Proteína Circumesporozoíta)
ChAd63	Adenovírus simiano sorotipo 63
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
CyRPA	<i>Cysteine-Rich Protective Antigen</i> (Antígeno Protetor Rico em Cisteína)
CZS	Cruzeiro do Sul
DBP	<i>Duffy Binding Protein</i> (Proteína de Ligação ao antígeno Duffy)
DC	<i>Dendritic cell</i> (Célula Dendritica)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Desvio Padrão
EBA	<i>Erythrocyte Binding Antigen</i> (Antígeno de Ligação ao Eritrócito)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
FcR	<i>Fc receptor</i> (Receptor Fc)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	Força da gravidade
GJ	Guajará
GLURP	<i>Glutamate-Rich Protein</i> (Proteína Rica em Glutamato)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Haplótipos
Hd	Diversidade haplotípica
HBsAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HCL	Ácido clorídrico
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
IEDB	<i>Immune Epitope DataBase and Analysis Resource</i> (Banco de dados de Epítopos Imunes e Recurso de Análise)
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPA	Incidência Parasitária Anual
k	Número médio de diferenças nucleotídicas
LPS	<i>Long Peptide Synthetic</i> (Peptídeo Sintético Longo)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
Min	Minuto
ML	Mâncio Lima
mL	Mililitro
mM	Milimolar
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
MSP-1	<i>Merozoite Surface Protein 1</i> (Proteína 1 de Superfície do Merozoíto)
MSP-3	<i>Merozoite Surface Protein 3</i> (Proteína 3 de Superfície do Merozoíto)
MVA	Vírus Vaccínia Ankara modificado

NCBI	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
<i>n</i>	Número
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
nsSNP	<i>Non-Synonyms Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Base Única não sinônimo)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> (Padrões Moleculares associados a Patógenos)
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salina)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEBS	<i>Pre-Erythrocytic and Blood-Stage Protein</i> (Proteína de Estágio Pré-Eritrocítico e Eritrocítico)
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores de Reconhecimento Padrão)
Rh5	<i>Reticulocyte-binding Protein Homolog 5</i> (Proteína Homóloga 5 de ligação a Reticulócitos)
RPM	Rotações por minuto
S	Número de sítios segregantes
SERA5	<i>Serine Repeat Antigen 5</i> (Antígeno 5 de Repetição da Serina)
SFB	Soro Fetal Bovino
SFC	<i>Spot-forming cells</i> (Células Formadoras de <i>Spot</i> )
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismos de Base Única)
sSNP	<i>Synonyms Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Base Única sinônimo)
s25	<i>Ookinete Surface Protein 25</i> (Proteína 25 de Superfície de Oocinetos)
s48/45	<i>Gametocyte Surface Protein 48/45</i> (Proteína 48/45 de Superfície do Gametócito)
s230	<i>Gametocyte Surface Protein 230</i> (Proteína 230 de Superfície do Gametócito)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)



TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TEX1	<i>Trophozoite Exported Protein 1</i> (Proteína 1 Exportada de Trofozoíto)
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Transformador)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TNK	Célula T <i>natural killer</i>
TRAP	<i>Thrombospondin-Related Anonymous Protein</i> (Proteína Adesiva Relacionada à Trombospondina)
Treg	Célula T regulatória
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VLP	<i>Virus-Like Particle</i> (Partícula semelhante a vírus)
Vng	Variante <i>n</i> do gene <i>PfGLURP</i>
Vnm	Variante <i>n</i> do gene <i>PfMSP-3</i>
VS	Variante Selvagem
w/v	Peso/volume
$\pi$	Diversidade nucleotídica

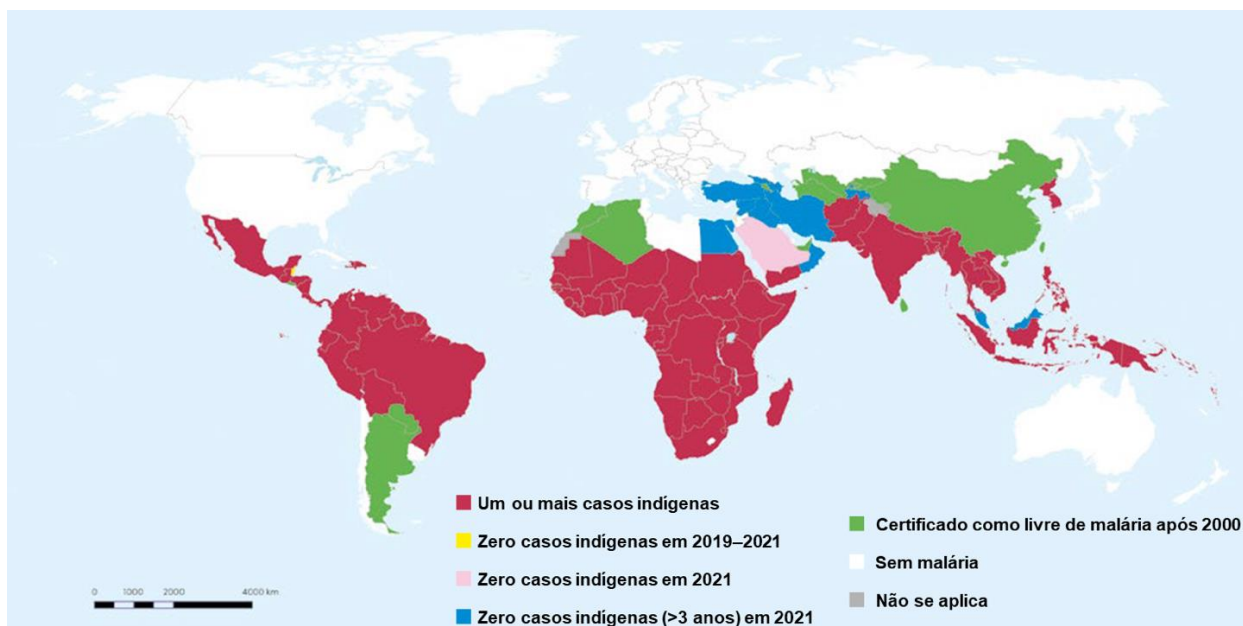
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Malária: Aspectos gerais

A malária é uma doença infecto-parasitária de elevada prevalência e morbidade, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Mais de 250 espécies de *Plasmodium* já foram descritas por parasitar mamíferos, aves e répteis (1), entretanto poucas são capazes de infectar naturalmente o homem. Dentre elas, o *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch 1897), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) e *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), classicamente conhecidas como agentes etiológicos da malária humana, e *Plasmodium knowlesi* (Singh, 2004), *Plasmodium inui* (Coatney, 1966), *Plasmodium cynomolgi* (Ta, 2014), *Plasmodium simium* (Brasil, 2017) e *Plasmodium brasilianum* (Lalremruata, 2015), parasitos de primatas não humanos, responsáveis pela transmissão zoonótica (1). A transmissão da malária se dá através da picada do inseto vetor, as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, que compreende mais de 465 espécies, das quais aproximadamente 70 são transmissoras da malária humana (2). Dentre elas, 41 são consideradas espécies vetoras dominantes no mundo (3), destacando-se o *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* e *Anopheles funestus* na África, *Anopheles darlingi*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis* e *Anopheles aquasalis* nas Américas, enquanto na Ásia diversas espécies apresentam domínio variável (2,3).

A malária permanece como um dos principais problemas de saúde pública, estando presente em 84 países das regiões tropicais e subtropicais do mundo (Figura 1), pondo em risco cerca de metade da população mundial. Estima-se que, em 2021 ocorreram cerca de 247 milhões de casos de malária no mundo e 619 mil mortes, a maioria (76,8%) de crianças menores de 5 anos de idade (4). Apesar dos avanços no seu controle obtidos nos últimos 20 anos, o aumento de 13,4 milhões de casos e 63 mil mortes foram notificados entre o período de 2020 a 2021 quando comparados a 2019, atribuídos, principalmente, às interrupções dos serviços de vigilância e controle da malária durante a pandemia de COVID-19 (4,5). As espécies *P. vivax* e *P. falciparum* são as principais responsáveis pelos índices de malária no mundo (6). Embora o *P. vivax* seja mais amplamente distribuído no globo, estando presente em áreas endêmicas da Ásia, Oceania, e Américas do Sul e Central, e já

terem sido descritos casos graves e mortes na infecção por essa espécie (7–10), o *P. falciparum* é o principal causador dos casos e óbitos (4).

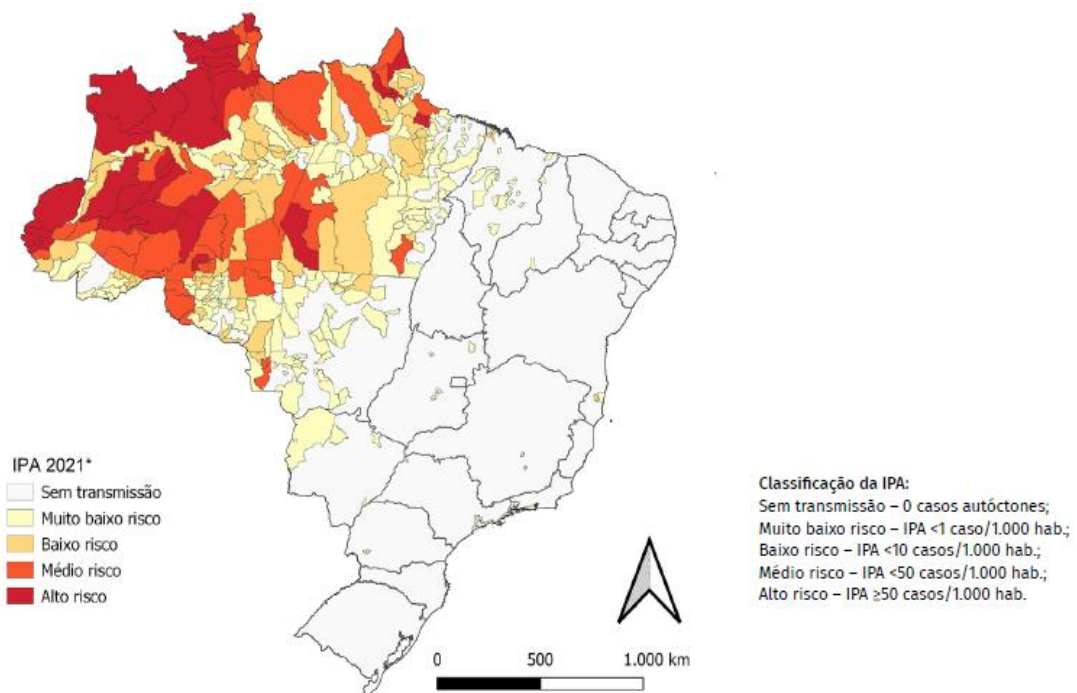


**Figura 1: Distribuição global da malária, 2021.** Fonte: Adaptado de WHO, 2022 (4).

A maioria dos casos por malária ocorre na região Africana (94.7%), seguido do Mediterrâneo Oriental (2.5%), Sudeste Asiático (2.2%), Pacífico Ocidental (0.6%) e Américas (0,3%) (4). Apesar das Américas contribuírem com menos de 1% dos casos de malária no mundo, números significativos de casos e mortes são reportados nessa região. De todos os países e territórios da região das Américas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 18 (Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname e Venezuela) possuem áreas com risco de transmissão ativa de malária, sendo registrados 646 mil casos e 334 mortes no ano de 2021 (4).

O Brasil contribuiu com cerca de 27% dos casos de malária das Américas em 2021 (4), registrando 139.211 casos, sendo a grande maioria (99,9%) na Região Amazônica, área endêmica da doença, que inclui os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 2) (11). Nos outros estados, os casos registrados são quase todos importados da Região Amazônica ou de outros países onde ocorre a transmissão. Entretanto casos autóctones na região extra-amazônica também são notificados, principalmente em

áreas de Mata Atlântica (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) devido à manutenção da transmissão por pacientes assintomáticos e reservatórios em primatas não humanos (12), ocorrendo surtos esporádicos, que resultam no aumento de casos em áreas de baixa transmissão ou reintrodução em áreas suscetíveis, assim como o possível aumento da letalidade, em consequência do diagnóstico tardio e manejo clínico inadequado. Apesar do aumento de casos de malária no mundo, no Brasil uma redução de 11,6% casos foi registrada em 2021 em relação a 2019, quando foram notificados 157.457 casos da doença. Em contrapartida, em relação ao total de casos notificados no país, um aumento (36.5%) das infecções causadas pelo *P. falciparum* e malária mista foi observada (11). Ainda que o *P. falciparum*, principal causador dos casos graves e óbitos, seja proporcionalmente responsável por um número menor de casos (16,8%) (11), a infecção por esta espécie ainda é motivo de preocupação no Brasil. A descrição de isolados de *P. falciparum* com eficácia reduzida a derivados de artemisinina (ACT), primeira linha de tratamento para malária *falciparum* não complicada, no Suriname e Guiana (13,14), sinalizou o risco do surgimento e introdução de isolados resistentes no Brasil.



Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Excluídas lâminas de verificação de cura. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022. Dados do Sinan atualizados em: 10/3/2022.  
\*Dados de 2021 são preliminares, sujeitos a alterações.

**Figura 2: Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2021.**  
Fonte: SVS, 2022 (11).

## 1.2. Ciclo biológico do *Plasmodium* spp.

O ciclo biológico do *Plasmodium* spp. (Figura 3) é extremamente complexo e pode ser dividido em duas fases bem distintas: a fase assexuada (esquizogônica), ocorrendo no hospedeiro vertebrado, e a fase sexuada (esporogônica), que ocorre no hospedeiro invertebrado, a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (15).

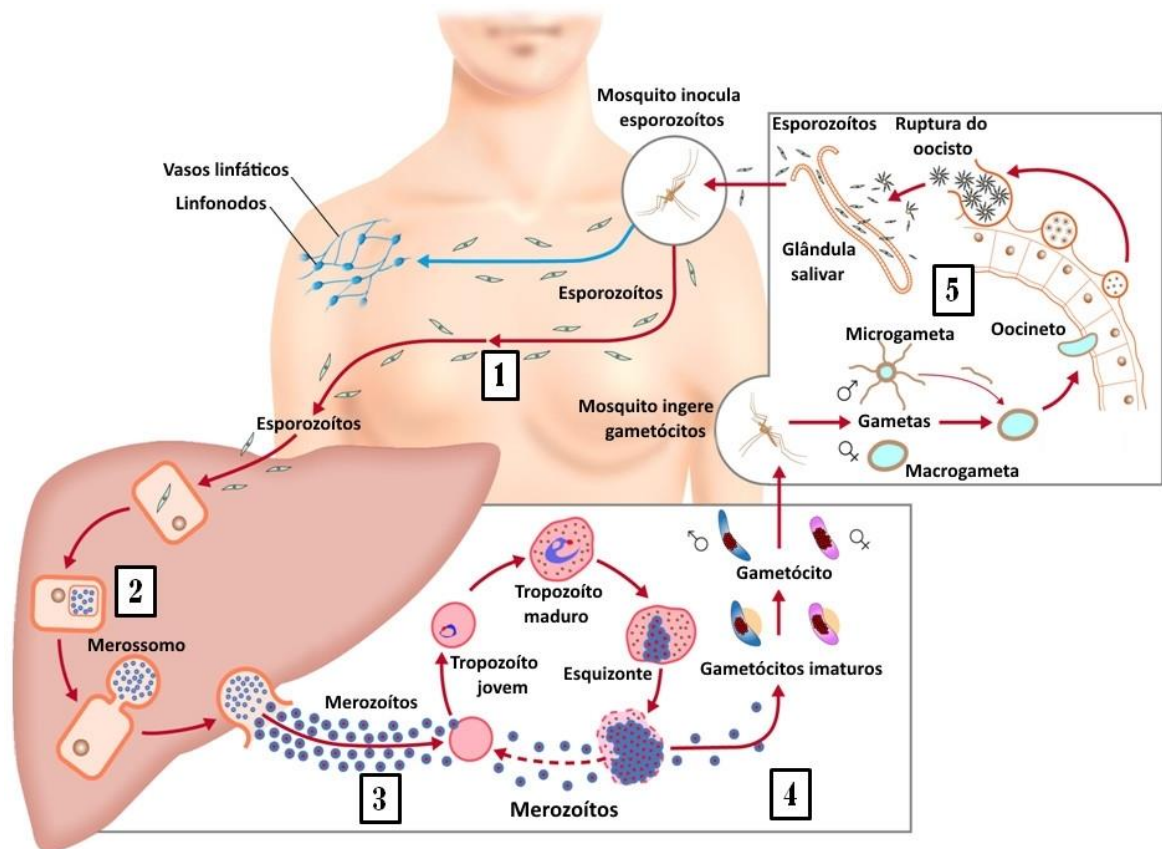
A infecção no homem se inicia quando as fêmeas do mosquito infectadas, durante seu repasto sanguíneo, inoculam na pele humana os esporozoítos (formas infectantes do parasito para o homem) acumulados em suas glândulas salivares (16). Na pele, esses esporozoítos se movem ativamente passando por várias células até entrar nos vasos linfáticos ou sanguíneos, e passam a ser transportados, passivamente, para os linfonodos, onde a maioria dos parasitos é eliminado pelas células fagocíticas, ou para a rede capilar hepática (sinusóides) (17,18), atravessando a barreira endotelial para entrada no parênquima hepático. Ao chegar no fígado, os esporozoítos atravessam múltiplos hepatócitos através da ruptura de sua membrana (19,20), até que as moléculas de adesão do parasito reconheçam moléculas sulfatadas da membrana dos hepatócitos (21), às quais se aderem e permite a penetração do parasito na célula hepática, através da invaginação da membrana plasmática do hepatócito, formando um vacúolo parasitóforo que circunda o esporozoíto. Dentro do vacúolo parasitóforo os parasitos se diferenciam em uma forma replicativa (trofozoíto pré-eritrocítico), que sofre sucessivas divisões nucleares durante seu processo de maturação, dando origem aos esquizontes hepáticos repletos de merozoítos (20–24). Essa fase do ciclo é chamada de pré-eritrocítica, na qual, ao seu término, as células hepáticas se rompem, formando merossomas (vesículas formadas da membrana plasmática das células hepáticas contendo os merozoítos). Esses merossomas são levados para o lúmen sinusoidal, e eventualmente se rompem nos capilares pulmonares, liberando os merozoítos na corrente sanguínea capazes de invadir eritrócitos (21,25).

No ciclo do *P. vivax* e *P. ovale* nem todos os esporozoítos que infectam hepatócitos entram em processo de esquizogonia. Ao invés disso, eles se diferenciam em formas hepáticas latentes, chamadas hipnozoítos, que podem permanecer dormente por meses ou anos até serem reativados, permitindo as recaídas tardias (26).

A invasão dos merozoítos nos eritrócitos dá início ao ciclo eritrocítico, sendo este um processo complexo, mediado pela interação de proteínas na superfície dos merozoítos e receptores na membrana dos eritrócitos (27). Inicialmente, os merozoítos reconhecem os eritrócitos através de interações não específicas, reversíveis e de baixa afinidade, realizadas por proteínas da superfície dos merozoítos, levando a uma ligeira deformação da superfície do eritrócito ao aumentar a área de contato com o merozoíto (28). Após este primeiro contato, os merozoítos reorientam sua extremidade apical em direção à membrana do eritrócito, estabelecendo ligações de alta afinidade, formando uma junção entre as membranas das duas células (28,29). Em seguida, o merozoíto penetra o eritrócito utilizando um motor de actina-miosina, formando um vacúolo parasitóforo ao seu redor (30). No interior do vacúolo parasitóforo, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens e maduros, que se multiplicam, dando origem a esquizontes repletos de merozoítos sanguíneos (31). Com o amadurecimento do esquizonte, ocorre a lise da membrana do vacúolo parasitóforo, seguida da lise dos eritrócitos, liberando os merozoítos sanguíneos, que invadirão novos eritrócitos (32). Na fase eritrocítica, ocorre a sintomatologia característica da malária, como febre, calafrios e sudorese, devido à hemólise dos eritrócitos infectados, liberando endotoxinas do parasito junto aos merozoítos (33). Após alguns ciclos eritrocíticos, alguns merozoítos ao invadirem os eritrócitos se diferenciam em formas eritrocíticas sexuadas do parasito (34), os gametócitos femininos (macrogametócitos) e os gametócitos masculinos (microgametócitos), que passam por estágios de maturação (I-V). Somente os gametócitos maduros são encontrados no sangue periférico, que ao serem ingeridos por um mosquito durante um repasto sanguíneo dão início ao ciclo esporogônico (35,36).

Ao realizar o repasto sanguíneo, as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* podem ingerir gametócitos dentro de eritrócitos (37), além de outras formas do parasito. No intestino médio do mosquito, com os movimentos de contração e expansão, mudança de temperatura e pH, e exposição ao ácido xanturênico, os gametócitos são ativados para a formação de gametas femininos e masculinos, rompendo os eritrócitos e ficando livres no intestino do mosquito (36,38). Os macrogametócitos amadurecem em macrogametas, enquanto o núcleo dos microgametócitos se divide em diversas partículas de cromatina e sofrem o

processo de exflagelação, se desenvolvem em microgametas que se desprendem do corpo residual e se movimentam no intestino do mosquito até encontrar o macrogameta (39,40). O microgameta se adere ao macrogameta e suas membranas são fusionadas (36). Com a fusão dos gametas masculinos e femininos ocorre a fertilização, formando um zigoto diploide, que se desenvolve em um zigoto móvel, denominado oocineto. O oocineto atravessa a matriz peritrófica e migra através do epitélio intestinal do mosquito, depositando-se sobre a membrana basal e se diferenciando em oocisto (35,41). O oocisto se multiplica por esporogônia, gerando milhares de esporozoítos em seu interior (42). Após sua maturação, o oocisto se rompe liberando na hemolinfa do mosquito os esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do inseto (35,41,42). Os esporozoítos invadem a glândula salivar do mosquito pela invaginação da membrana celular epitelial basal, formando um vacúolo parasitóforo, que rapidamente é desintegrado, seguido por sua saída pela membrana apical da célula hospedeira, resultando na liberação dos esporozoítos na cavidade secretória central da glândula salivar (43). Dessa maneira, ao realizar um novo repasto sanguíneo, os esporozoítos serão inoculados na pele do hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo do parasito.



**Figura 3: Ciclo evolutivo do *Plasmodium* spp..** 1) A infecção no homem se inicia quando as fêmeas do mosquito *Anopheles* inoculam os esporozoítos ao fazer o repasto sanguíneo. Os esporozoítos migram para o fígado pela corrente sanguínea. 2) No fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos e se multiplicam por esquizogonia, dando origem aos esquizontes hepáticos, as células hepáticas se rompem liberando os merossomos. 3) Os merossomos se rompem na corrente sanguínea, liberando os merozoítos, que invadem os eritrócitos e se multiplicam por esquizogonia, dando origem a esquizontes sanguíneos repletos de merozoítos. Os eritrócitos se rompem liberando os merozoítos na corrente sanguínea, que invadirão novos eritrócitos. 4) Alguns merozoítos ao invadirem os eritrócitos, se diferenciam em gametócitos, que são ingeridos pelos *Anopheles* durante o repasto sanguíneo, dando início ao ciclo esporogônico. 5) No intestino do mosquito, macrogameta e microgameta se encontram, ocorrendo a fertilização, resultando na formação de um zigoto, que se desenvolve em um oocineto móvel. O oocineto migra através do epitélio do intestino do mosquito e se deposita sobre a membrana basal, onde se diferencia em oocisto. O oocisto se multiplica por esporogonia, gerando milhares de esporozoítos que, ao final da maturação, são liberados na hemocele do mosquito e migram para as glândulas salivares. Ao realizar o resposto sanguíneo, os esporozoítos serão inoculados no hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo. Fonte: Adaptado de Garcia-Basteiro et al., 2012 (44).

### 1.3. Resposta imune antimalárica

Indivíduos residentes em áreas de alta transmissão e endemicidade de malária desenvolvem progressivamente uma imunidade clínica, primeiramente contra as formas graves da doença e depois contra as manifestações clínicas, na qual a replicação do parasito é controlada (45). Esse tipo de imunidade clínica, denominada premunição, requer anos de exposição contínua para ser desenvolvida



e não gera uma proteção estéril e duradoura, podendo ser considerada uma adaptação devido a incessante estimulação antigênica por este parasito nos indivíduos residentes em regiões endêmicas de malária (46). Entretanto, os mecanismos que levam a este estado de premunicação não são completamente compreendidos.

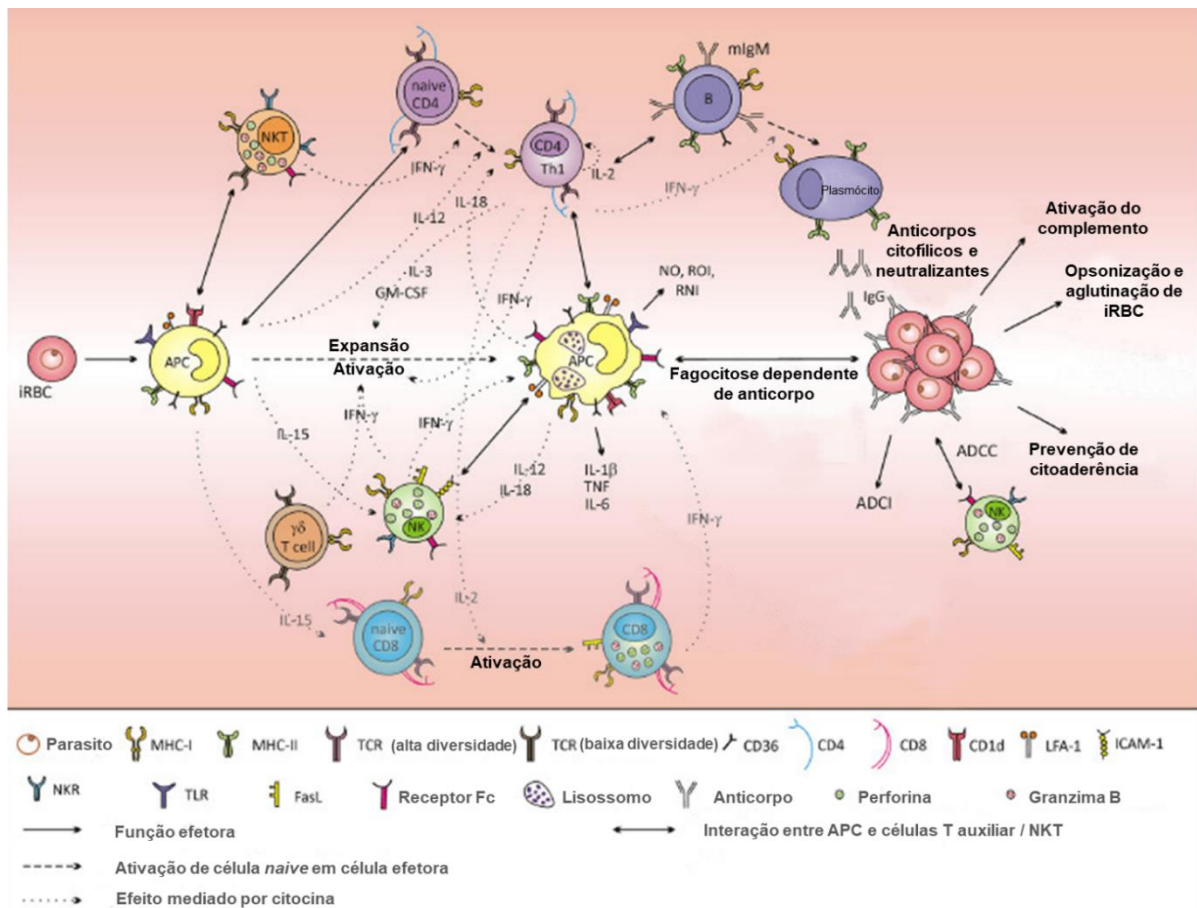
A resposta imune antimalárica é extremamente complexa e multifatorial, sendo espécie, estágio e antígeno específica (47) e envolve uma variedade de funções efetoras do sistema imunológico do hospedeiro, abrangendo diferentes tipos celulares, citocinas e anticorpos específicos que atuam de forma coordenada e balanceada em diferentes estágios do ciclo de vida do parasito (Figura 4) (47).

Durante a infecção aguda, células fagocíticas, como monócitos/macrófagos e células dendríticas (*Dendritic cell* - DC) reconhecem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Pattern* – PAMPs) do parasito através de Receptores de Reconhecimento Padrão (*Pattern Recognition Receptors* – PRRs) e os fagocitam. Após a fagocitose, ocorre a ativação transcricional e secreção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a Interleucina-12 (IL-12), IL-15 e IL-18, responsáveis pelo recrutamento e ativação de outras células do sistema imune inato, como células *Natural Killer* (NK), células T  $\gamma\delta$  e células TNK que secretam grande quantidade de citocinas, incluindo Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) necessário para ativar e melhorar o processo de fagocitose (48). Paralelamente, células apresentadoras de antígenos (*Antigen-presenting cells* – APCs) especializadas apresentam antígenos provenientes do parasito no contexto do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe II para células T CD4<sup>+</sup> *naive* (Th0), estimulando a diferenciação e polarização em diferentes subtipos celulares (49). Na presença de moléculas coestimulatórias e IL-12, e ausência de IL-10, uma forte resposta pró-inflamatória (Th1) é induzida por células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor* - TNF) (48), importante para o desenvolvimento de uma eficiente resposta imune antimalárica. Entretanto, a resposta inflamatória exacerbada também é prejudicial, relacionada com a imunopatologia da doença. Nesse cenário, um subconjunto de células T regulatórias (Treg) com um fenótipo imunossupressor, importantes para manter a homeostase imunológica, são induzidas durante a infecção em decorrência do efeito sinérgico do Fator de

Crescimento Transformador beta (*Transforming Growth Factor* - TGF- $\beta$ ) e IL-10 produzidas por monócitos. Essas células produzem altos níveis de IL-10 que suprimem a ativação, proliferação e função efetoras de linfócitos T (47,48).

A produção de anticorpos contra antígenos proteicos requer a interação entre linfócitos B e antígenos do parasito através do receptor de células B (*B cell receptor* - BCR) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> nas áreas extrafoliculares dos órgãos linfoides periféricos, acarretando a proliferação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos de vida curta produtores de anticorpos de baixa afinidade capazes de controlar o crescimento do parasito durante a infecção, entretanto, após alguns dias essas células sofrem apoptose (50). Para a geração de plasmócitos de vida longa e células B de memória algumas células migram para os folículos linfoides, formando centros germinativos, onde a interação entre células dendríticas e linfócitos T auxiliares foliculares ativam os linfócitos B, estimulando a mudança de classe e maturação de afinidade (46,51). Importaneamente, a presença de citocinas específicas são críticas para esse processo, tais como IL-6 e IL-21 que regulam a sobrevivência e diferenciação celular das células B, além de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 que estimulam, predominantemente, a mudança de isotipo para anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3), mas em excesso também impedem a maturação das células T auxiliares foliculares e promove a expansão de células B de memória atípicas (52). Plasmócitos de vida longa secretam, constitutivamente níveis basais de anticorpos de alta afinidade, enquanto os linfócitos B de memória são quiescentes e, após a reexposição ao mesmo antígeno, se diferenciam rapidamente em células efetoras, secretando anticorpos de alta afinidade (50,51).

Linfócitos T CD8<sup>+</sup> também são ativados durante a infecção via MHC de classe I, tanto por células apresentadoras de antígenos especializadas como por hepatócitos infectados e expressam citocinas pró-inflamatórias, assim como destroem as células infectadas através sua atividade citotóxica (46).



**Figura 4: Resposta imune antimalárica.** Células apresentadoras de antígenos reconhecem proteínas do parasito na superfície de merozoítos e eritrócitos infectados. Após a fagocitose, essas células secretam citocinas pró-inflamatórias. A secreção de IL-12, IL-15 e IL-18 ativam outras células do sistema imune inato, que começam a liberar grandes quantidades de citocinas, incluindo IFN $\gamma$ . APCs apresentam antígenos do parasito no contexto de MHC de classe II, ativando as respostas imune adaptativa de célula T e B. As células B s diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos específicos com diferentes funções. Células T CD8+ também são ativadas durante a infecção no contexto de MHC de classe I. Adaptado de Deroost et al., 2016 (48).

### 1.3.1. Resposta imune contra o estágio pré-eritrocítico

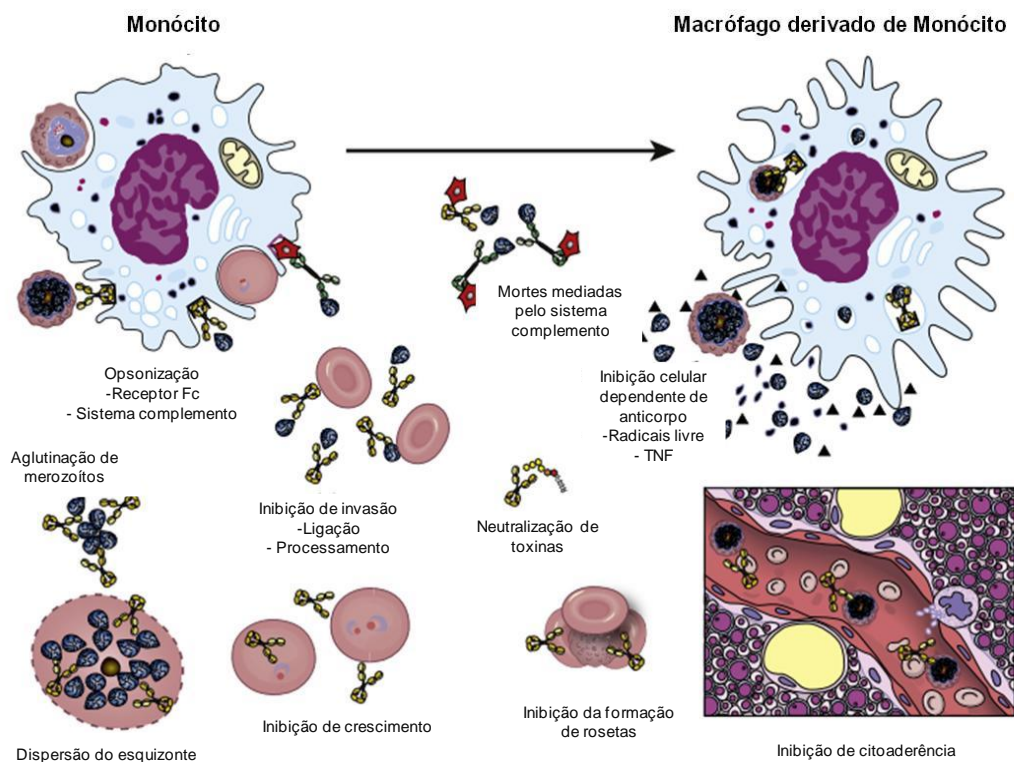
A resposta imune pré-eritrocítica tem como alvo os esporozoítos livres e hepatócitos infectados. A importância dos anticorpos contra esporozoítos foi primeiramente demonstrada em 1967, quando a imunização de camundongos com esporozoítos de *P. berghei* atenuados por irradiação induziu a produção de anticorpos neutralizantes capazes de protegê-los contra o desafio com esporozoítos não irradiados (53), posteriormente observado em primatas não humanos (54) e humanos (55). Além disso, anticorpos contra antígenos de esporozoítos também podem ser identificados após a infecção natural por *Plasmodium* spp. (56,57). Esses anticorpos podem prevenir a invasão de hepatócitos bloqueando proteínas

essenciais para a travessia ou invasão celular, opsonizando os esporozoítos para promover a fagocitose e ativando o sistema complemento (58). Entretanto, os esporozoítos levam um curto período para alcançar e invadir os hepatócitos, o que pode ser insuficiente para a ativação, diferenciação e secreção de altos níveis de anticorpos de alta afinidade. Após invadir uma célula hepática, anticorpos podem reconhecer antígenos na superfície de hepatócitos infectados, destruindo-os através do mecanismo celular dependente de anticorpo mediado pelas células de Kupffer e NK (59). A resposta imune contra as formas intra-hepáticas do parasito é, principalmente, mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup> (60). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem peptídeos derivados do parasito apresentados pelo MHC de classe I na superfície dos hepatócitos infectados e células de Kupffer, levando-os a produção de IFN- $\gamma$  que tem um potente efeito inibidor sobre o desenvolvimento dos parasitos no estágio hepático (47), e a liberação de granzimas e perforinas que induzem apoptose através da cascata de caspase e estresse oxidativo (61,62).

### **1.3.2. Resposta imune contra o estágio eritrocítico**

A resposta imune contra os estágios eritrocíticos do *Plasmodium* spp. tem como alvo os merozoítos livres e eritrócitos infectados. Embora linfócitos T CD8<sup>+</sup> possuam um papel importante na resposta imune contra o estágio hepático do parasito, estudos sugerem um limitado papel dessas células na proteção contra o estágio eritrocítico (47). Em contrapartida, linfócitos T CD4<sup>+</sup> tem uma importante função na regulação da resposta imune, pela produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, ativação de macrófagos e clones específicos de células B (59). Considerando que os eritrócitos não expressam moléculas de MHC, os anticorpos são primordiais para o controle de parasitos nesse estágio (47), podendo atuar (Figura 5): I) bloqueando proteínas fundamentais para o processo de invasão do merozoíto ao eritrócito (63), contendo o desenvolvimento do parasito ou inibindo a ruptura de esquizontes e, conseqüentemente, a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea (64–66); II) ligando-se a antígenos de superfície de merozoítos e eritrócitos infectados, e receptores Fc (FcR) expressos em diferentes tipos celulares, desencadeando funções efetoras, facilitando seu reconhecimento pelas células fagocíticas (64,67), ativando monócitos através do mecanismo de inibição celular dependente de anticorpos (*Antibody-Dependent Cellular Inhibition* – ADCI) para a liberação de fatores parasitostáticos solúveis, incluindo Fator de Necrose Tumoral

alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha* – TNF- $\alpha$ ), que impedem o desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito (68), ativando neutrófilos através do mecanismo de explosão respiratória dependente de anticorpos (*Antibody-Dependent Respiratory Burst* – ADRB) induzindo a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicas para o parasito (69), e ativando células NK através do mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* – ADCC) induzindo sua degranulação, assim como a secreção de IFN- $\gamma$ , provocando a lise de eritrócitos infectados (70); III) ativando o sistema complemento, se ligando ao merozoíto e a primeira molécula da via clássica do complemento, C1q, acarretando na lise celular, fagocitose do merozoíto ou aumento da atividade neutralizante (71,72); IV) inibindo a adesão de eritrócitos parasitados ao endotélio vascular e a eritrócitos não parasitados, fato importante, considerando que a capacidade de adesão de eritrócitos infectados está associada aos casos graves da doença (64); V) e neutralizando toxinas liberadas pelo parasito após a ruptura dos eritrócitos prevenindo a indução de um processo inflamatório exacerbado (73).



**Figura 5: Representação esquemática de mecanismos mediados por anticorpos na imunidade contra as formas eritrocíticas do *P. falciparum*.** Anticorpos contra merozoítos podem: prevenir a invasão de eritrócitos, ativar sistema complemento, opsonizar merozoítas e estimular monócitos e macrófagos para liberar moléculas parasitostáticas, matando parasitos intra-eritrocíticos. Anticorpos contra eritrócitos infectados podem: inibir a citoaderência, impedir a formação de rosetas, opsonizar eritrócitos infectados e inibir o desenvolvimento intracelular do parasito. TNF: Fator de necrose tumoral. Fonte: Adaptado de Teo et al., 2016 (64).

#### 1.4. A busca por uma vacina antimalárica

As estratégias utilizadas para o controle da malária são baseadas no controle vetorial e diagnóstico e tratamento oportunos. Apesar da notável redução de casos nos últimos anos, fatores como o surgimento, em alguns países, de isolados resistentes às Terapias Combinadas à base de Artemisinina (*Artemisinin-based Combination Therapies* - ACTs), primeira linha de tratamento de malária não-complicada por *P. falciparum* em todos os países endêmicos (14,74–77), e a resistência de *Anopheles* aos inseticidas atualmente disponíveis (78), evidenciam a necessidade de uma vacina eficaz, complementando as estratégias de controle existentes.

As principais dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica são a complexidade do parasito e seu ciclo evolutivo, a limitada compreensão das interações com o hospedeiro e a extensa diversidade genética do parasito (79). 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 imune distintas (80). Essa complexidade gera um aumento nos antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica e determinar quais os antígenos são capazes de induzir uma resposta imune protetora continua a ser um árduo desafio.

Apesar de todos os obstáculos existentes, dados evidenciam que o desenvolvimento de uma vacina antimalárica é possível. Apesar da malária não gerar imunidade estéril e duradora, indivíduos residentes em áreas endêmicas expostos cronicamente a infecção desenvolvem uma imunidade protetora contra a doença clínica. Essa proteção pode ser transferida através da administração de imunoglobulinas de adultos naturalmente imunes para crianças infectadas com altas parasitemias e manifestações clínicas, reduzindo a severidade da doença (81,82). Mas a primeira evidência da possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra malária ocorreu quando a cientista brasileira, Nussenzweig e colaboradores, demonstraram que a imunização de camundongos com esporozoítos de *P. berghei* atenuados por irradiação promoveu a proteção desses animais contra o desafio com esporozoítos não atenuados (53), posteriormente observados em primatas não humanos e humanos, quando imunizados com esporozoítos atenuados de *P.*

*knowlesi* e *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (54,55). Esses resultados impulsionaram os estudos para o desenvolvimento da vacina antimalárica por diversos grupos de pesquisa.

Considerando a complexidade do ciclo biológico do *Plasmodium* spp., os esporozoítos, hepatócitos infectados, merozoítos livres e eritrócitos infectados com formas sexuadas e assexuadas são importantes alvos para o desenvolvimento de uma vacina (83).

As vacinas contra as formas pré-eritrocíticas poderiam impedir a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos, ou, ocorrendo a penetração, destruir os hepatócitos infectados, evitando o desenvolvimento do parasito no seu interior e, conseqüentemente, prevenindo a evolução da doença (45). Vacinas contra esse estágio possuem grande destaque em função ao baixo número de esporozoítos inoculados pelo mosquito durante o repasto sanguíneo, entretanto, uma elevada eficácia é necessária para conter o desenvolvimento da doença, uma vez que um pequeno número de parasitos é suficiente para que a infecção atinja o estágio eritrocítico (84,85).

As vacinas contra as formas eritrocíticas assexuadas poderiam impedir a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos e o desenvolvimento em seu interior, controlando e/ou prevenindo a doença através da redução significativa da carga parasitária e dos sintomas clínicos, tendo um grande impacto na morbidade e mortalidade em áreas endêmicas de malária (73,86). A maior parte dos antígenos candidatos a vacina antimalárica tem como alvo o estágio eritrocítico assexuado devido a resposta imune adquirida após repetidas infecções ser, principalmente, contra as formas sanguíneas do parasito, refletindo a maior disponibilidade do antígeno e estimulação imunológica (79).

As vacinas contra as formas eritrocíticas sexuadas são denominadas bloqueadoras de transmissão e, tem como alvo antígenos expressos na superfície de gametócitos, zigotos ou oocinetos. Essas não teriam capacidade de induzir uma resposta imune protetora para o indivíduo vacinado, mas sim impossibilitar o desenvolvimento do parasito no inseto vetor, bloqueando a fertilização e/ou a passagem do oocineto pelo intestino médio do mosquito, reduzindo ou impedindo a

produção de esporozoítos, e por consequência a transmissão do parasito (45). No entanto, a estratégia ideal para a utilização de vacinas bloqueadoras de transmissão seria em associação a uma vacina antiparasitária (73,86).

As pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina eficaz têm focado, principalmente, em determinar antígenos-alvo fundamentais para o desenvolvimento e sobrevivência do parasito. Muitos antígenos já foram identificados e testados em ensaios pré-clínicos e clínicos (Tabela 1) (87–89), entretanto, até o momento, somente a RTS,S alcançou importantes resultados.



**Tabela 1: Principais candidatas a vacina antimalárica em ensaios clínicos ativos.**

VACINA	ANTIGENO	MECANISMO	STATUS ATUAL
<b>RTS,S/AS01</b>	Região repetitiva central e C-terminal da CSP de fusionada a região N-terminal do HBsAg e uma porção HBsAg livre ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Implementação piloto Recomendada e pré-qualificada pela OMS Fase IV
<b>R21/MatrixM</b>	Região repetitiva central e C-terminal da CSP fusionada a região N-terminal do HBsAg ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase III
<b>PfSPZ</b>	Esporozoítios atenuados por radiação ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase II
<b>PfSPZ-CVac</b>	Esporozoítios não atenuados sob quimioprofilaxia ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase II
<b>PvCSP</b>	CSP recombinante ( <i>P. vivax</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase II
<b>PvSPZ</b>	Esporozoítios atenuados por radiação ( <i>P. vivax</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase II
<b>Pf7G8</b>	Esporozoítio quimicamente atenuado ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase I
<b>VLPM01</b>	Região repetitiva central da CSP em VLP ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase I
<b>rCSP/AP10-602</b>	CSP recombinante ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase I
<b>PfGAP3-KO e PfSPZ-GA1</b>	Esporozoítios geneticamente atenuados ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase I

**Tabela 1: (Continuação) Principais candidatas a vacina antimalárica em ensaios clínicos ativos.**

VACINA	ANTIGENO	MECANISMO	STATUS ATUAL
<b>FMP013 e FMP014</b>	Antígenos baseados na CSP em nanopartículas ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase I
<b>DNA-ChAd63 PfCSP</b>	CSP codificada em DNA (prime) e ChAd63 (boost) ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito	Fase I
<b>ChAd63-MVA PvDBP</b>	Região II da DBP codificada nos vetores ChAd63 (prime) e MVA (boost) ( <i>P. vivax</i> )	Prevenir a invasão do eritrócito	Fase II
<b>ChAd63-MVA Rh5</b>	RH5 codificada nos vetores ChAd63 e MVA ( <i>P. falciparum</i> )	Prevenir a invasão do eritrócito	Fase I
<b>BK-SE36</b>	Região N-terminal do SERA5 ( <i>P. falciparum</i> )	Prevenir a invasão do eritrócito	Fase I
<b>DNA-ChAd63 PfCSP PfAMA-1 ME-TRAP</b>	CSP, AMA-1 e ME-TRAP (múltiplos epítomos de diversos antígenos pré-eritrocíticos fusionados ao alelo T9/96 da TRAP) codificados em DNA (prime) e ChAd63 (boost) ( <i>P. falciparum</i> )	Inibir da motilidade do esporozoítio e prevenir a invasão do hepatócito e eritrócito	Fase I
<b>Pfs25M-EPA/AS01B, Pfs230D1M- EPA/AS01B</b>	s25 e domínio 1 da s230 conjugadas com a Exoproteína A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P. falciparum</i> )	Inibe o desenvolvimento do oocineto	Fase II
<b>Pfs25-IMX313/MatrixM</b>	s25 fusionada a IMX313 ( <i>P. falciparum</i> )	Inibe o desenvolvimento do oocineto	Fase I
<b>Pvs25- IMX313/MatrixM</b>	s25 fusionada a IMX313 ( <i>P. vivax</i> )	Inibe o desenvolvimento do oocineto	Fase I

OMS: Organização Mundial de Saúde; CSP: Proteína Circumesporozoítio; HBsAg: Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B; VLP: Partícula Semelhante a Vírus ;ChAd63: Adenovírus simiano sorotipo 63; MVA: Vírus Vaccínia Ankara modificado; TRAP: Proteína Adesiva relacionada à trombospondina; AMA-1: Antígeno 1 de Membrana Apical; SERA5: Antígeno de Repetição da Serina 5; Rh5: Proteína Homóloga de ligação a reticulócitos 5; DBP: Proteína de ligação ao antígeno Duffy; s25: Proteína 25 de Superfície de Oocinetos; s230: Proteína 230 de Superfície do Gametócito; Adaptado de : Frimpong A et al., 2018 (89); Bonam S et al., 2021 (87); Pirahmadi S et al., 2021 (88); Malaria World Report 22 (4).

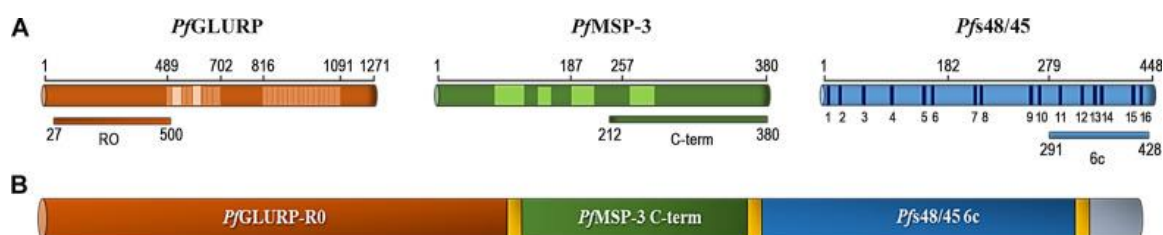
A RTS,S/AS01 (*Mosquirix*<sup>TM</sup>) é a vacina antimalárica que se encontra em estágio mais avançado, sendo a primeira a alcançar os ensaios clínicos de fase III, e recentemente recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o amplo uso entre crianças de regiões com transmissão moderada a alta de malária por *P. falciparum* (90). A RTS,S consiste na região repetitiva central (constituída por repetições de 4 aminoácidos – Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina, NANP-, epítopo imunodominante de célula B) e C-terminal (incluindo epítopos de célula T) da Proteína Circumsporozoíta (*Circumsporozoite Protein* – CSP), principal proteína que recobre o esporozoíto, fusionada a região N-terminal do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) e uma porção HBsAg livre, expressos em *Saccharomyces cerevisie* (91). Essa vacina demonstrou eficácia de 31.1% e 55.8% em crianças de 6-12 semanas e 5-17 meses, respectivamente, durante 12 meses após a terceira dose da vacina. Após a quarta dose (dose reforço), a eficácia da RTS,S/AS01 permaneceu por 7 anos, reduzindo em 40% os episódios e 30% as admissões hospitalares de malária grave (92). Apesar da queda da eficácia ao longo do tempo, essa vacina é uma conquista histórica, um avanço para ciência, para saúde infantil e para o controle da doença. Contudo, é preciso continuar a busca por candidatas vacinais com maior eficácia e para outras espécies de *Plasmodium*, visto que a OMS prevê que o imunizante ideal tenha eficácia de pelo menos 75%. Outras vacinas como a R21/MM, também baseada na proteína CS de *P. falciparum*; a PfPRH5 e a PvDBP, duas vacinas de estágio sanguíneo e a Pfs230D1M, uma vacina bloqueadora de transmissão tem se mostrado promissoras (4,93–97).

As extensas descobertas de novos antígenos de diversos estágios do ciclo do parasito aliados ao conhecimento prévio, em ensaios vacinais, das dificuldades de induzir uma resposta imune protetora com foco em apenas um estágio do ciclo biológico do parasito, iniciaram o desenvolvimento de candidatos vacinais multiestágio. Uma vacina que tem como alvo diferentes proteínas expressas em fases distintas do ciclo biológico do parasito poderia induzir uma resposta imunológica capaz de inibir a invasão e o desenvolvimento do parasito no interior da célula hospedeira e, assegurar que os parasitos não neutralizados sejam alvo na fase subsequente (79), conferindo uma melhor proteção. Algumas candidatas a vacinas antimaláricas em desenvolvimento combinaram dois antígenos do mesmo estágio, mas poucos tentaram visar múltiplos estágios numa única formulação.

Nesse sentido, acredita-se que uma candidata a vacina ideal teria como alvos diferentes estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*.

### 1.5. A proteína recombinante GMZ2.6c

A GMZ2 é uma proteína recombinante expressa em *Lactococcus lactis*, contendo os fragmentos conservados da região C-terminal da Proteína 3 de Superfície do Merozoíto (MSP-3) e N-terminal (R0) da Proteína Rica em Glutamato (GLURP) (98). Ensaio clínico têm demonstrado que a GMZ2 é bem tolerada, segura e imunogênica e que os elevados títulos de anticorpos IgG citofílicos induzidos após imunização são específicos e funcionais, capazes de controlar o crescimento *in vitro* de *P. falciparum* na presença de monócitos (99–103). Além disso, foram demonstrados alta prevalência e títulos de anticorpos naturalmente adquiridos contra a GMZ2 e seus componentes em indivíduos residentes em áreas de alta endemicidade de malária na África (100,102,104). Acredita-se que a GMZ2 possui um efeito sinérgico, visto que foram observados maiores títulos de anticorpos contra ela quando comparado aos seus fragmentos individuais (104). Ensaio clínico têm demonstrado a baixa eficácia da GMZ2 (105–107), entretanto, pode ter um grande impacto no combate a malária, principalmente se combinada a um antígeno candidato a vacina bloqueadora de transmissão. Nesse contexto, o fragmento C-terminal (6C) da Proteína 48/45 de Superfície de Gametócito (s48/45) foi geneticamente fusionado a GMZ2, originando uma nova proteína recombinante candidata a vacina antimalárica multiestágio contra o *P. falciparum* denominada GMZ2.6c (Figura 6) (108). Essa candidata vacinal poderia proteger os indivíduos vacinados e reduzir a transmissão do parasito na comunidade.



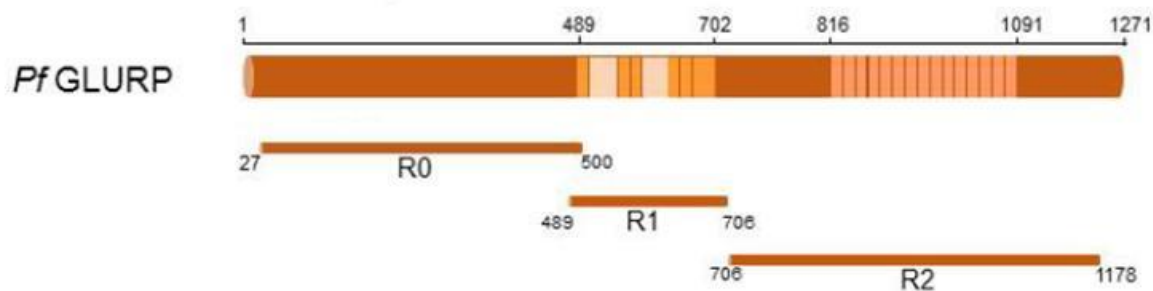
**Figura 6: Representação esquemática da PfGLURP, PfMSP-3, Pfs48/45 e da proteína híbrida GMZ2.6c.** A. Representação esquemática da PfGLURP (vermelho), mostrando a região N-terminal, PfMSP-3 (verde), mostrando a região C-terminal e Pfs48/45 (azul), mostrando a região 6c. B. Representação esquemática da GMZ2.6c. Em laranja estão identificados os resíduos Arginina-Serina (RS) e em marrom a etiqueta de poli-histidina. Fonte: Baptista BO, et al., 2022 (109).

Esses antígenos foram selecionados como candidatos vacinais a partir de um racional que utilizou vários parâmetros. A maioria dos critérios correspondeu aos comumente utilizados para candidatos vacinais, como a imunogenicidade dos antígenos em indivíduos naturalmente expostos a malária, a correlação dos títulos de anticorpos específicos com proteção clínica de indivíduos de áreas endêmicas e o papel funcional de anticorpos específicos de inibir o crescimento do parasito *in vitro* ou bloquear a transmissão de *P. falciparum* (110–123). Estudos preliminares realizados em camundongos mostraram que a imunização com a GMZ2.6c foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos específicos e células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF (108). Até o momento, não há dados disponíveis sobre a antigenicidade ou imunogenicidade da GMZ2.6c em humanos.

### **1.5.1. Proteína Rica em Glutamato (GLURP)**

A Proteína Rica em Glutamato (GLURP) é expressa em todos os estágios do *P. falciparum* no hospedeiro vertebrado, estando presente no vacúolo parasitóforo dos esquizontes hepáticos e sanguíneos, na superfície dos merozoítos e no citoplasma de eritrócitos parasitados com gametócitos, sendo liberada com a ruptura dos esquizontes (124,125). A GLURP está localizada no complexo proteico *Pfs38* na superfície do merozoíto, que se liga diretamente aos eritrócitos do hospedeiro via Glicoforina A durante a invasão do merozoíto e formação do vacúolo parasitóforo (126,127).

A GLURP possui uma sequência N-terminal não repetitiva (R0), e duas sequências repetitivas central (R1) e C-terminal (R2) (Figura 7) (128). A região R0 é altamente conservada em isolados de diferentes regiões geográficas (129), enquanto a R2 possui um elevado grau de polimorfismo, associado ao número de sequências repetitivas que modifica o tamanho do gene e da proteína codificada, sendo observado até 20 alelos em áreas de alta endemicidade (130–133).



**Figura 7: Representação esquemática da Proteína GLURP de *P. falciparum*, mostrando as regiões N-terminal (R0), central (R1) e C-terminal (R2).** Fonte: Theisen et al., 2017 (107).

Em estudos imunoepidemiológicos realizados em áreas de alta endemicidade de malária na África, foi observado que indivíduos clinicamente imunes possuíam altos níveis de anticorpos naturalmente adquiridos contra a GLURP (114,134,135), capazes de controlar a carga parasitária e, conseqüentemente, a doença (136,137). Além disso, em ensaios clínicos de fase I, a imunização com a GLURP<sub>85-213</sub> induziu anticorpos específicos capazes de inibir o crescimento *in vitro* do *P. falciparum* (138).

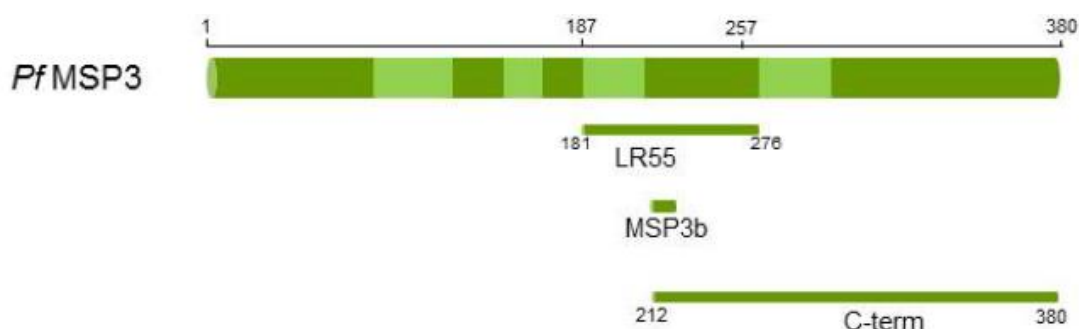
A resposta imune contra a GLURP é predominantemente citofílica (IgG1 e IgG3) (113,138–141), anticorpos citofílicos podem agir em cooperação com monócitos através do mecanismo de ADCI, impedindo o desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito. Estudos realizados em indivíduos residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira mostraram uma prevalência de 67% e 79% respondedores para as regiões R0 e R2, respectivamente (120). Trabalhos anteriores já haviam demonstrado a imunodominância da região R2 comparada a R0 (135,142), entretanto anticorpos anti-R0 são mais eficazes no mecanismo de ADCI (117,123).

### **1.5.2. Proteína 3 de Superfície do Merozoíto (MSP-3)**

A Proteína 3 de Superfície do Merozoíto (MSP-3) é sintetizada durante o estágio de esquizonte como um precursor de peso molecular variável e liberada no vacúolo parasitóforo, onde sofre um processamento proteolítico. Alguns fragmentos estão associados a superfície dos merozoítos, porém a maioria é liberada na circulação sanguínea e no sobrenadante de cultura *in vitro* de *P. falciparum* com o rompimento dos esquizontes (143). A MSP-3 possui um papel importante no processo de invasão dos merozoítos aos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, além

de proteger o parasito do grupo heme tóxico, gerado pela metabolização da hemoglobina, liberado durante o seu egresso da célula hospedeira (144).

A MSP-3 possui uma região N-terminal composta de três blocos de quatro “*heptad repeats*” de alanina, separados por regiões não repetitivas e, uma região C-terminal rica em resíduos de ácido glutâmico, seguido por outro motivo de repetição “*heptad repeats*” semelhante ao encontrado nos zíperes de leucina (Figura 8) (143). A comparação das sequências do gene que codifica a MSP-3 em cepas de laboratório permitiu a identificação de um padrão dimórfico, com sequencias alélicas incluídas dentro de duas principais classes, 3D7 e K1 (145). Essa variação é atribuída a inserções e deleções (*Indels*) e às substituições de nucleotídeos dentro dos domínios de “*heptad repeats*” de alanina na região N-terminal. Contudo, a região C-terminal é altamente conservada (145–148).



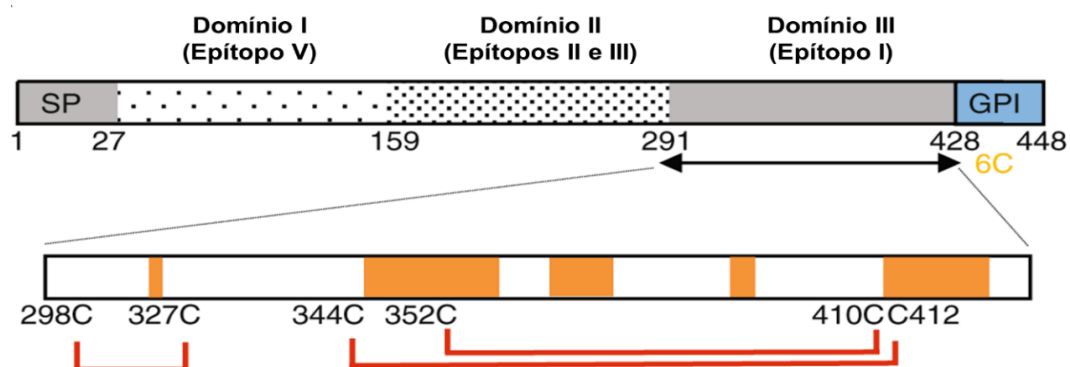
**Figura 8: Representação esquemática da proteína MSP-3 de *P. falciparum*, mostrando a região C-terminal e os peptídeos LR55 e MSP3b.** Fonte: Theisen *et al.*, 2017 (107).

Estudos demonstraram que indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária possuem altos níveis de anticorpos contra a MSP-3 e, interessantemente, aqueles clinicamente imunes tinham uma predominância de anticorpos IgG citofílicos (IgG1 e IgG3), enquanto os não imunes apresentavam uma maior prevalência de anticorpos IgG2 e IgM (121,122), sugerindo que estes anticorpos poderiam estar competindo pelo antígeno, impedindo mecanismos efetores. Essa hipótese é apoiada pelo fato de anticorpos naturalmente adquiridos de indivíduos clinicamente imunes e anticorpos induzidos após imunização com a MSP-3-LPS serem capazes de interagir com monócitos através do mecanismo de ADCI e inibir o crescimento o *P. falciparum in vitro* (149,150).

### 1.5.3. Proteína 48/45 de Superfície de Gametócito (s48/45)

A Proteína 48/45 de Superfície de Gametócito (s48/45) é expressa na superfície dos gametócitos nos estágios III a V de desenvolvimento presentes na circulação sanguínea (151). Durante o repasto sanguíneo, o *Anopheles* pode ingerir eritrócitos parasitados com gametócitos. No intestino do mosquito, esses eritrócitos se rompem, expondo a s48/45 (108). A s48/45 possui um papel fundamental na fertilização, promovendo o contato dos gametas masculinos com os gametas femininos através da adesão celular mediada pelas s48/45 e a proteína 230 de superfície do gametócito (s230) (36), sendo, portanto, uma das principais candidatas a vacina bloqueadora de transmissão (152–154).

A *Pfs48/45* é uma proteína rica em cisteína, organizada em três domínios, uma região C-terminal (Epítipo I), uma região central (contendo os epítipos II e III) e uma região N-terminal (Epítipo V) (Figura 9) (155). Proteínas provenientes de estágios sexuais sofrem uma menor pressão do sistema imune, consequentemente, possuem um menor número de polimorfismos. Estudos demonstram que as regiões genicas que codificam os epítipos I, II e III da *Pfs48/45* são altamente conservados em diferentes isolados, apresentando um limitado número de polimorfismos geograficamente específicos (156,157).



**Figura 9: Representação esquemática da proteína s48/45 de *P. falciparum* mostrando os domínios I (contendo o epítipo V), II (contendo os epítipos II e III) e III (contendo o epítipo I), evidenciando o fragmento 6C.** As linhas vermelhas representam o padrão de ligação das pontes disulfeto aos resíduos de cisteína. SP: Peptídeo sinal; GPI: Âncora de Glicosilfosfatidilinositol. Fonte: Adaptado de Kundu P et al., 2018 (158).



Indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária possuem anticorpos naturalmente adquiridos contra a *Pfs48/45*, e esses anticorpos são capazes de prevenir o desenvolvimento do parasito no hospedeiro invertebrado, bloqueando ou reduzindo a transmissão (98,119,155,159). Não só os anticorpos naturalmente adquiridos, mas a imunização de camundongos e primatas não humanos com o epítopo I da *Pfs48/45* também induziu altos níveis de anticorpos capazes de reduzir a transmissão em até 93% (152,153). Esses dados justificam a *Pfs48/45* como uma potente candidata a vacina bloqueadora de transmissão e, sua fusão a proteína recombinante GMZ2.

## **1.6. Justificativa**

Estima-se que ocorram cerca de 247 milhões de novos casos e mais de 600 mil mortes por malária no mundo, a maioria de crianças menores de 5 anos de idade. O desenvolvimento de novas armas para o enfrentamento dessa endemia é de grande prioridade para o bem-estar e a melhoria do índice de desenvolvimento humano das populações afetadas. Uma vacina eficaz é a arma mais potente para reduzir de forma drástica essas estatísticas e prevenir a doença.

Nosso Laboratório tem avaliado o perfil da resposta imune contra antígenos de *P. falciparum* em populações da Amazônia Brasileira visando identificar o potencial antigênico e imunogênico de moléculas que possam fornecer informações que contribuam para o delineamento de candidatas vacinais. A GMZ2.6c é uma proteína quimérica candidata a vacina multiestágio contra *Plasmodium falciparum* composta de um fragmento da proteína de estágio sexuado *Pfs48/45-6C* geneticamente fusionado a GMZ2, uma proteína quimérica contendo a GLURP e MSP-3. A GMZ2, demonstrou ser bem tolerada, segura e imunogênica em ensaios clínicos realizados em áreas endêmicas de malária na África. Contudo, não há dados disponíveis sobre a antigenicidade ou imunogenicidade da GMZ2.6c em humanos.

O papel protetor dos anticorpos tem sido demonstrado desde os experimentos de transferência de soro de adultos imunes de áreas endêmicas de malária para crianças com malária severa e mostraram um acentuado efeito na diminuição da parasitemia e na melhora dos sintomas clínicos. Além disso, estudos

tem revelado que células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, células NK, células dendríticas, macrófagos e outras células do sistema imune são críticas no desenvolvimento da imunidade contra as formas hepáticas e eritrocíticas do *P. falciparum*. Entretanto, trabalhos realizados em áreas de alta endemicidade na África vêm demonstrando que polimorfismos genéticos do *P. falciparum* são capazes de modular a resposta imune específica.

Considerando que os parasitos que circulam no Brasil podem apresentar características genéticas diferentes dos parasitos que circulam na África e que os indivíduos naturalmente expostos na Amazônia Brasileira são etnicamente diferentes dos indivíduos africanos, torna-se importante a realização de estudos imunogenéticos 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. A avaliação detalhada do perfil das respostas imune humoral e celular contra a GMZ2.6c e seus componentes (GLURP, MSP-3 e Pfs48/45) e da influência dos polimorfismos genéticos do parasito no desenvolvimento da resposta imune específica podem gerar dados que ressaltem o potencial da GMZ2.6c como candidata a uma vacina antimalárica e no futuro, ser testada na população de regiões endêmicas da Amazônia Brasileira.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil das respostas imune humoral e celular contra a proteína recombinante GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e *Pfs48/45*) em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira e a influência do polimorfismo genético do parasito na modulação da resposta imune específica.

### 2.2. Objetivos específicos

- ❖ Avaliar o perfil da resposta imune humoral contra a proteína GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e *Pfs48/45*) em indivíduos naturalmente expostos a infecção residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira;
- ❖ Avaliar o perfil da resposta imune celular contra a proteína GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e *Pfs48/45*) em indivíduos expostos a infecção residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira;
- ❖ Identificar e validar os epítomos de célula B e T imunodominantes da GMZ2.6c nas populações estudadas;
- ❖ Avaliar a relevância da GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e *Pfs48/45*) no processo de aquisição de uma imunidade antiparasitária pela análise do perfil da resposta imune e pelos dados pessoais, clínicos e epidemiológicos;
- ❖ Avaliar a presença de polimorfismos genéticos das proteínas MSP-3, GLURP e *Pfs48/45* e sua influência no desenvolvimento da resposta imune específica.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Artigo 1 - 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

A GMZ2.6c é uma proteína quimérica candidata a vacina multiestágio contra *Plasmodium falciparum* que contém o fragmento de estágio sexuado Pfs48/45-6C geneticamente fusionado a GMZ2, uma proteína quimérica contendo a GLURP e MSP-3. A GMZ2 demonstrou ser bem tolerada, segura e imunogênica em ensaios clínicos realizados em áreas endêmicas de malária na África. Contudo, não há dados disponíveis sobre a antigenicidade ou imunogenicidade da GMZ2.6c em humanos. Considerando que os parasitos circulantes podem ser geneticamente distintos em diferentes áreas endêmicas de malária e que fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar a resposta imunológica contra antígenos vacinais, é importante verificar a antigenicidade, imunogenicidade e possível associação com proteção em indivíduos residentes de áreas endêmicas de malária com diferentes cenários epidemiológicos. Nesse trabalho, o perfil da resposta anticorpo contra a GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45) em residentes da Amazônia Brasileira naturalmente expostos a malária com diferentes níveis de transmissão, foi avaliado. Esse estudo foi realizado utilizando amostras de plasma de 352 indivíduos de Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima, Acre, e Guajará, Amazonas. Anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE específicos e subclasses de IgG foram detectados pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA). Os resultados mostraram que a proteína GMZ2.6c foi amplamente reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos de indivíduos de áreas endêmicas com diferentes níveis de transmissão. A maior prevalência de indivíduos com anticorpos contra a GMZ2.6c quando comparado com seus fragmentos individuais pode sugerir um efeito aditivo da GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 quando inseridos na mesma construção. Além disso, indivíduos naturalmente expostos a malária possuíam, predominantemente, anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 anti-GMZ2.6c, fato importante considerando que da imunidade protetora contra a malária resulta de um balanço delicado entre anticorpos citofílicos/não citofílicos. Curiosamente, anticorpos anti-GMZ2.6c parecem aumentar com a exposição à


infecção e podem contribuir para a imunidade parasitária. Nossos dados mostraram que a proteína GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos de indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária no Brasil e que esses anticorpos podem contribuir com a imunidade antiparasitária. Esses dados realçam a importância da GMZ2.6c como uma candidata a vacina antimalárica.

RESEARCH

Open Access



# 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

Barbara Oliveira Baptista<sup>1,2</sup>, Ana Beatriz Lopes de Souza<sup>1,2</sup>, Evelyn Kety Pratt Riccio<sup>1,2</sup>, Cesare Bianco-Junior<sup>1,2</sup>, Paulo Renato Rivas Totino<sup>1,2</sup>, João Herminio Martins da Silva<sup>3</sup>, Michael Theisen<sup>4</sup>, Susheel Kumar Singh<sup>4</sup>, Linda Eva Amoah<sup>5</sup>, Marcelo Ribeiro-Alves<sup>6</sup>, Rodrigo Medeiros Souza<sup>7</sup>, Josué Costa Lima-Junior<sup>8</sup>, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro<sup>1,2</sup> and Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>1,2\*</sup> 

## Abstract

**Background:** The GMZ2.6c malaria vaccine candidate is a multi-stage *Plasmodium falciparum* chimeric protein which contains a fragment of the sexual-stage Pfs48/45-6C protein genetically fused to GMZ2, a fusion protein of GLURP and MSP-3, that has been shown to be well tolerated, safe and immunogenic in clinical trials performed in a malaria-endemic area of Africa. However, there is no data available on the antigenicity or immunogenicity of GMZ2.6c in humans. Considering that circulating parasites can be genetically distinct in different malaria-endemic areas and that host genetic factors can influence the immune response to vaccine antigens, it is important to verify the antigenicity, immunogenicity and the possibility of associated protection in individuals living in malaria-endemic areas with different epidemiological scenarios. Herein, the profile of antibody response against GMZ2.6c and its components (MSP-3, GLURP and Pfs48/45) in residents of the Brazilian Amazon naturally exposed to malaria, in areas with different levels of transmission, was evaluated.

**Methods:** This study was performed using serum samples from 352 individuals from Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima, in the state of Acre, and Guajará, in the state of Amazonas. Specific IgG, IgM, IgA and IgE antibodies and IgG subclasses were detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

**Results:** The results showed that GMZ2.6c protein was widely recognized by naturally acquired antibodies from individuals of the Brazilian endemic areas with different levels of transmission. The higher prevalence of individuals with antibodies against GMZ2.6c when compared to its individual components may suggest an additive effect of GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 when inserted in a same construct. Furthermore, naturally malaria-exposed individuals predominantly had IgG1 and IgG3 cytophilic anti-GMZ2.6c antibodies, an important fact considering that the acquisition of anti-malaria protective immunity results from a delicate balance between cytophilic/non-cytophilic antibodies.

\*Correspondence: riccio@ioc.fiocruz.br

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa em Malária, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Interestingly, anti-GMZ2.6c antibodies seem to increase with exposure to malaria infection and may contribute to parasite immunity.

**Conclusions:** The data showed that GMZ2.6c protein is widely recognized by naturally acquired antibodies from individuals living in malaria-endemic areas in Brazil and that these may contribute to parasite immunity. These data highlight the importance of GMZ2.6c as a candidate for an anti-malarial vaccine.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, Immune response, Antibodies, GMZ2.6c, Vaccine

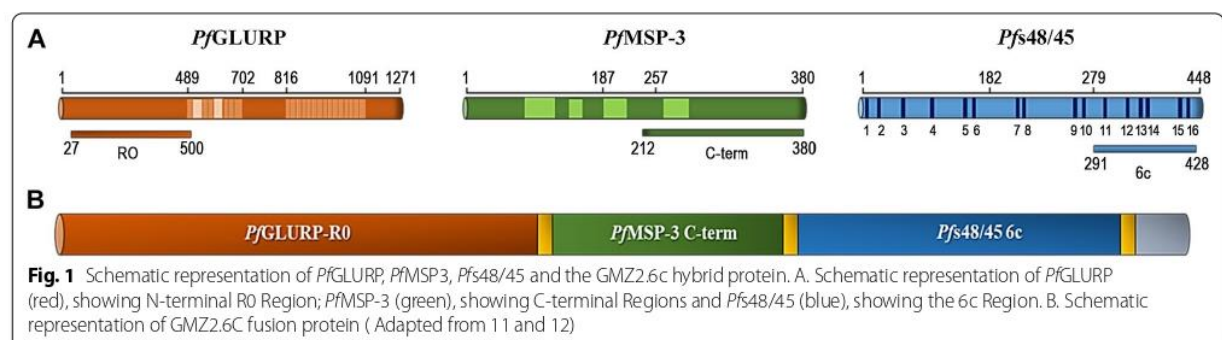
## Background

Malaria, an infectious parasitic disease caused by blood-borne apicomplexan parasites of the genus *Plasmodium*, remains a tremendous burden to global public health, causing 405,000 deaths annually and generating morbidity to more than two hundred million of individuals [1]. Among the seven *Plasmodium* species able to infect humans, *Plasmodium falciparum* is responsible for most of the severe cases and deaths [1]. Control, elimination, and the ultimate eradication of malaria will require effective therapeutics. Artemisinin-based combination therapy (ACT) is currently the first-line of therapy for uncomplicated *P. falciparum* malaria infection in most parts of the world; however, resistance to artemisinin and to its partner combination drugs has developed in the Greater Mekong Subregion (GMS) and more recently in South America [2–7], highlighting the need for the development and implementation of an effective vaccine [8]. Malaria vaccine efforts have focused on determining which of the antigens expressed by *P. falciparum* are targets of protective immunity.

The GMZ2.6c malaria vaccine candidate is a multi-stage *P. falciparum* chimeric protein that contains a fragment of the sexual-stage Pfs48/45-6C protein genetically fused to recombinant protein GMZ2, an asexual-stage vaccine construct consisting of the N-terminal region of the Glutamate-Rich Protein (GLURP) and the C-terminal region of Merozoite Surface Protein-3 (MSP-3) [9, 10] (Fig. 1).

GLURP is expressed in both pre-erythrocytic and erythrocytic stages in the vertebrate host and may participate in the binding to receptors on erythrocytes surface during merozoite invasion and formation of the parasitophorous vacuole; MSP-3 is expressed in the erythrocytic stage and has a crucial role not only in binding to the host red blood cell, but also in protecting the parasite against haem that is released during parasite egression; Pfs48/45 is expressed on the surface of gametocytes and gametes playing an important role in fertilization, thus considered a candidate for the transmission-blocking vaccine [11–15]. GLURP, MSP-3 and Pfs48/45 vaccine candidates have been selected based on their immunogenicity in natural conditions of exposure, correlation between specific antibody titers with degrees of clinical protection of individuals living in endemic areas and/or the ability of antibodies to inhibit the *P. falciparum* in vitro growth [16–26]. A recent study with GMZ2.6c showed that this chimera elicits functional antibodies in mice and that the formulations containing synthetic TLR4 agonist glucopyranosyl lipid adjuvant (GLA) or synthetic lipid adjuvant (SLA) induce high parasite-specific antibody titers, IFN- $\gamma$  responses in CD4 + TH1 cells, and a high percentage of multifunctional CD4 + T cells expressing IFN- $\gamma$  and TNF in response to GMZ2.6c [9].

Until now, there is no data available on the antigenicity or immunogenicity of GMZ2.6c in humans. However, clinical trials performed in a malaria-endemic area of Africa showed that GMZ2, the vaccine construct of GLURP and MSP-3, was well tolerated, safe, and immunogenic [27–31]. The immunization with



GMZ2 elicited high levels of specific and cytophilic IgG antibodies which mediated parasite killing in vitro as measured by antibody-dependent cellular inhibition (ADCI) assays, and decreased the incidence of clinical malaria in individuals with higher concentration of vaccine-induced anti-GMZ2 IgG antibodies [27–31]. Moreover, high antibody titers naturally acquired against GMZ2 and its components have been observed in individuals living in highly endemic areas in Africa [28, 30, 32] and are associated with lower parasite densities [33]. It is also believed that GLURP and MSP-3 has a synergistic effect, since higher prevalence individuals with antibodies as higher titers of antibodies were detected against GMZ2 compared to either of its components separately, in naturally exposed populations [32].

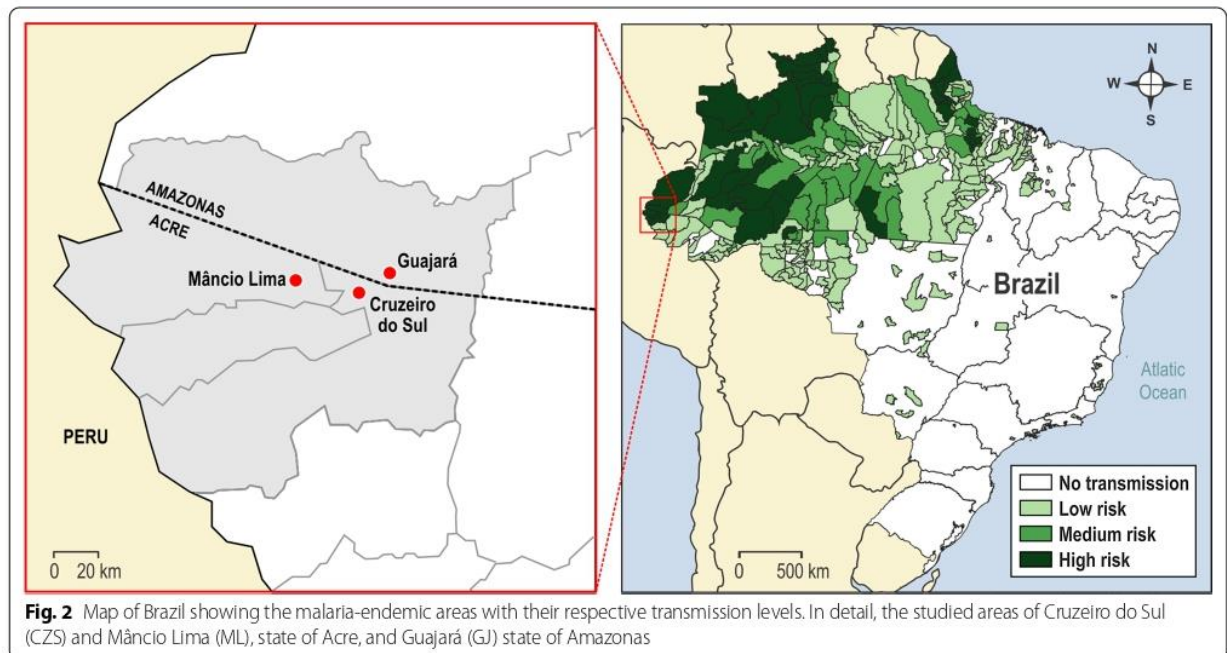
Considering that circulating parasites can be genetically distinct in different malaria-endemic areas and host genetic factors can influence the immune response to vaccine antigens, it is important to verify the antigenicity, immunogenicity, and the possibility of associated protection in malaria-endemic areas with different epidemiological scenarios. The goal of this work is, therefore, to evaluate the profile of antibody response against the chimeric protein GMZ2.6c and its components (MSP-3, GLURP and Pfs48/45) in residents of the Brazilian Amazon, naturally exposed to malaria, in areas with different levels of malaria transmission.

## Methods

### Study area and volunteers

A cross-sectional cohort study was carried out from June to August 2016, in three malaria-endemic areas of the Brazilian Amazon, where 99% of autochthonous cases are reported. Two of them, Cruzeiro do Sul (07°37'50"S/72°40'13"W) and Mâncio Lima (07°36'49"S/72°53'47"W), are high-risk areas situated at the Juruá Valley, state of Acre, and correspond, respectively, to the 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> main hotspots, among the 17 municipalities that concentrate 80% of falciparum malaria transmission in the whole Amazon. The Guajará municipality (02°58'18"S/57°40'38"W), a medium-risk area in the state of Amazonas (Fig. 2), was also included. [34]. In Brazil, the risk of contracting malaria is measured by the Annual Parasitological Indexes (API), which serves to classify transmission areas into high ( $\geq 50$ ), medium ( $< 50$  and  $\geq 10$ ), low risk ( $< 10$  and  $> 1$ ) and very low risk ( $< 1$ ), according to the number of autochthonous cases per 1,000 inhabitants. In 2016, a year of sample collection, Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima and Guajará registered, respectively, 5447, 1432 and 674 cases of falciparum malaria, and the API of 85.3, 67.3 and 43.3 for *P. falciparum*.

Serum samples were obtained from 299 malaria exposed individuals from Cruzeiro do Sul (CZS group,  $n = 124$ ), Mâncio Lima (ML group,  $n = 88$ ) and Guajará (GJ group,  $n = 87$ ). In addition, serum samples from individuals who have never had malaria were included in the





study as area control (CO group, n=53). All individuals from this group were negative for the presence of malaria parasites as assessed by thick blood films. Non-endemic control blood samples from 40 individuals from the laboratory staff (Rio de Janeiro, Brazil) who had neither history of malaria nor contact with malaria transmission areas, were included as Rio de Janeiro Controls.

#### Ethics statement

The study protocol was reviewed and approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee (CEP-FIOCRUZ CAAE 46,084,015.1.0000.5248), which included obtaining the following patients' written consents for research use of their blood samples. Written informed consent was obtained from all adult donors or from donor's parents in the cases of children. All the procedures adopted in this study fully complied with specific federal permits issued by the Brazilian Ministry of Health.

#### Epidemiological survey, malaria diagnosis, and blood sampling

Donors who provided informed consent also completed an epidemiological survey. In order to evaluate the degree of malaria exposure, subjects responded to questions related to personal data such as: age, time of residence in the endemic area, number of previous malaria episodes, the time elapsed from the last infection, use of malaria prophylaxis, and presence of symptoms.

Venous peripheral blood (20 ml) was collected into heparin or EDTA tubes for antibodies analyses and molecular diagnosis, respectively. The plasma was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and the pellets, containing peripheral blood cells collected into EDTA tubes, were mixed with equal volumes of a cryopreservation solution (0.9% NaCl/4.2% sorbitol/20% glycerol) and were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for later DNA extraction for molecular diagnosis. Thin and thick blood smears were examined for identification of malaria parasites by a technician experienced in malaria diagnosis from the Laboratory of Malaria Research (Fiocruz), which is the headquarters of the CEMART (Center for Malaria Research and Training), a reference center for malaria diagnosis in the Extra-Amazonian Region for the Brazilian Ministry of Health. Malaria diagnosis was performed in Giemsa-stained thin and thick blood smears, and parasitological evaluation was done by examination of 200 fields at  $1,000\times$  magnification under oil-immersion. Thin blood smears of the positive samples were examined for species identification. The parasitaemia was expressed as the number of parasites/ $\mu\text{l}$  of blood in the thick blood smear. The number of parasites/ $\mu\text{l}$  of blood was calculated by multiplying the number of parasites counted against 500 leucocytes, and the number

of leucocytes of the subject and dividing the product by 500. To increase the sensitivity of the parasite detection, molecular analyses were performed in all samples. Briefly, DNA was extracted from the blood samples using the QIAamp DNA blood midi kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) according to manufacturer instructions, and Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using specific primers for genus (*Plasmodium* sp) and species (*P. falciparum* and *Plasmodium vivax*), as previously described [35]. Positive donors for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated by the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health [36].

#### Recombinant proteins and antibody assays

The multi-stage GMZ2.6c construct was created from GLURP<sub>79-1500</sub> and MSP-3<sub>462-747</sub> fragments genetically fused to the Pfs48/45<sub>859-1284</sub> region (6c). GMZ2.6c and its fragments were expressed in *Lactococcus lactis* strain MG1363 and purified as previously described [9]. Briefly, *L. lactis* containing pSS4 was cultured in LAB medium supplemented 5 mM cysteamine/0.5 mM cystamine. The recombinant protein in the supernatant of the culture was purified by affinity chromatography with a 5 ml HisTrap<sup>TM</sup> HP column (GE Healthcare, Sweden) followed by a 5 ml HiTrap NHS-activated HP column containing monoclonal antibody mAb45.1 (epitope I), according to the manufacturer (GE Healthcare, Sweden). To assess purity in purified proteins, reversed-phase HPLC was performed, showing a relative purity  $\sim 95\%$ . Production of GLURP-R0, MSP3 and Pfs48/45-6C was done as previously described [37, 38].

Microtiter 96-well plates (Maxisorp, NUNC, Denmark) were coated with the recombinant proteins at an optimal dilution using phosphate-buffered saline at pH 7.2 (PBS) or a carbonate-bicarbonate buffer at pH 9.6 at 100  $\mu\text{l}$ /well overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  (Additional file 1: Table S1). The plates were washed, the uncoated sites were blocked and then plasma samples diluted 1:100 in dilution buffer were added in duplicate wells for each individual. The plates were washed, 100  $\mu\text{l}$  of peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG, IgM, IgA, or IgE (Sigma, St. Louis, MO), 1:1,000 in dilution buffer were added, and the plates were incubated for 1 h at RT or  $37^{\circ}\text{C}$ . To detect specific IgG subclass, plates were incubated with peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 (clones 4E3 for IgG1, 31-7-4 for IgG2, HP6050 for IgG3 and HP6025 for IgG4; SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) 1:1,000 in dilution buffer for 1 h at RT or  $37^{\circ}\text{C}$ . After washing, 100  $\mu\text{l}$  of a solution of 0.4 mg/ml orthophenylenediamine (OPD, Sigma) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck) in citrate-phosphate buffer at pH 5.0 (24 mM citric acid, Sigma, and 51 mM dibasic sodium phosphate, Sigma)

were added to each well, the plates were incubated for 5 min at room temperature in the dark, and then 50  $\mu$ l/well of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck) were added. Optical density (OD) was identified at 492 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Sera from five Rio de Janeiro controls were used to establish the normal range for each assay. The cut-off values were determined as the OD mean plus 3 standard deviations (SD) of the Rio de Janeiro controls. The results were expressed as a semi-quantitative Reactivity Indices (RIs), which were calculated by the OD mean of each tested individual divided by cut-off value. Subjects were scored as responders if the RI against each recombinant protein was higher than 1.0.

### Statistical analyses

Data were stored in the Epi-Info 6 (*Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA*) data bank software. Epi-Info and GraphPad InStat (*GraphPad Software, Inc*) statistical software programs were used for data analyses. Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney pairwise tests were used to analyse the differences in distributions of continuous numerical variables, and the chi-square analysis was applied to test independence of prevalence among groups. The Spearman rank coefficient test was used to analyse the correlation between variables.

## Results

### Population characteristics

The main characteristics of the studied groups are shown in Table 1. CZS, ML, and GJ groups were not different in

terms of gender, age, natural exposure to malaria infection, the time elapsed since the last malaria episode, and *P. falciparum* or *P. vivax* parasitaemia. However, the group ML showed a higher number of past malaria episodes than CZS and GJ, as well as GJ group had a longer time since symptom onset (number of past malaria episodes:  $P=0.01$ , ML versus CZS;  $P=0.0008$ , ML versus GJ; time of symptoms:  $P=0.003$ , GJ versus CZS and ML).

All individuals of the CO group were residents of the studied areas, CZS, ML or GJ but reported no previous malaria episode, and none had symptoms or circulating parasites at the time of collection. CO group showed a higher frequency of females and a lower mean of age and time of residence in malaria endemic area than CZS, ML and GJ groups (gender:  $P=0.008$ , CO versus CZS;  $P=0.03$ , CO versus ML;  $P=0.02$  CO versus GJ; age and time of residence in malaria endemic area:  $P<0.0001$ , CO versus CZS, ML and GJ, for all analyses).

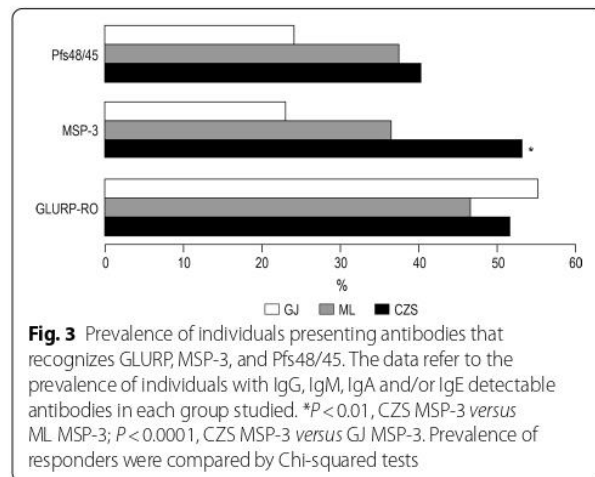
### Prevalence of antibody response against GMZ2.6c and its components, GLURP, MSP-3, and Pfs48/45

Considering the prevalence of individuals with detectable antibodies that recognize GMZ2.6c, regardless antibody class (whether IgG, IgM, IgA and/or IgE), GMZ2.6c was shown to be largely recognized by naturally acquired antibodies in the CZS, ML and GJ groups, and these three groups showed comparable prevalence of individuals presenting GMZ2.6c specific antibodies: 103/124 (83%), 65/88 (74%), and 63/87 (72%), respectively. The analyses of the prevalence of individuals with detectable antibodies that recognize GMZ2.6c components,

**Table 1** Personal, clinical, and epidemiological characteristics of the studied populations

		CZS <i>n</i> = 124	ML <i>n</i> = 88	GJ <i>n</i> = 87	CO <i>n</i> = 53
<i>Personal Data</i>					
Gender	Male	66 (53.2%)	44 (50%)	25 (51.7%)	16 (30.2%)
	Female	58 (46.8%)	44 (50%)	42 (48.3%)	37 (69.8%)*
Age (years)		33 $\pm$ 15.2	35.3 $\pm$ 15.8	36.9 $\pm$ 17	22.8 $\pm$ 6.2**
Time of residence in malaria-endemic area (years)		32.8 $\pm$ 15	34.3 $\pm$ 16.6	36.9 $\pm$ 17	21.7 $\pm$ 7.7**
<i>Clinical and Epidemiological Data</i>					
Number of past malaria episodes		10.2 $\pm$ 13	13 $\pm$ 13.3***	8.9 $\pm$ 10.3	NA
Time elapsed since the last malaria episode (months)		60 $\pm$ 97	28 $\pm$ 45	48 $\pm$ 73	NA
Time of symptoms (days)		4 $\pm$ 4	6 $\pm$ 14	8 $\pm$ 8****	NA
Diagnosis	<i>P. falciparum</i>	25 (20.2%)	12 (13.6%)	6 (6.7%)	NA
	<i>P. vivax</i>	39 (31.4%)	25 (28.4%)	11 (12.8%)	NA
Parasitaemia (parasites/ $\mu$ l of blood)	<i>P. falciparum</i>	16,000 $\pm$ 20,092	5600 $\pm$ 3577	8000 $\pm$ 5656	NA
	<i>P. vivax</i>	19,142 $\pm$ 17,559	23,294 $\pm$ 15,507	10,666 $\pm$ 8326	NA

\*  $P=0.008$ , CO versus CZS;  $P=0.03$ , CO versus ML;  $P=0.02$  CO versus GJ. \*\*  $P<0.0001$ , CO versus CZS, ML and GJ. \*\*\*  $P=0.01$ , ML versus CZS;  $P=0.0008$ , ML versus GJ. \*\*\*\*  $P=0.003$ , GJ versus CZS;  $P=0.003$ , GJ versus ML. *n*: number of individuals. Age, time of residence in malaria-endemic areas, number of previous malaria episodes, time elapsed since the last malaria episodes, time of symptoms and parasitaemia represent median  $\pm$  IQR (interquartile range) and were compared by Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney pairwise tests. Prevalence of gender and infective *Plasmodium* species at the time of collection (diagnosis) inter groups was compared by Chi-squared tests. NA: Not analysed

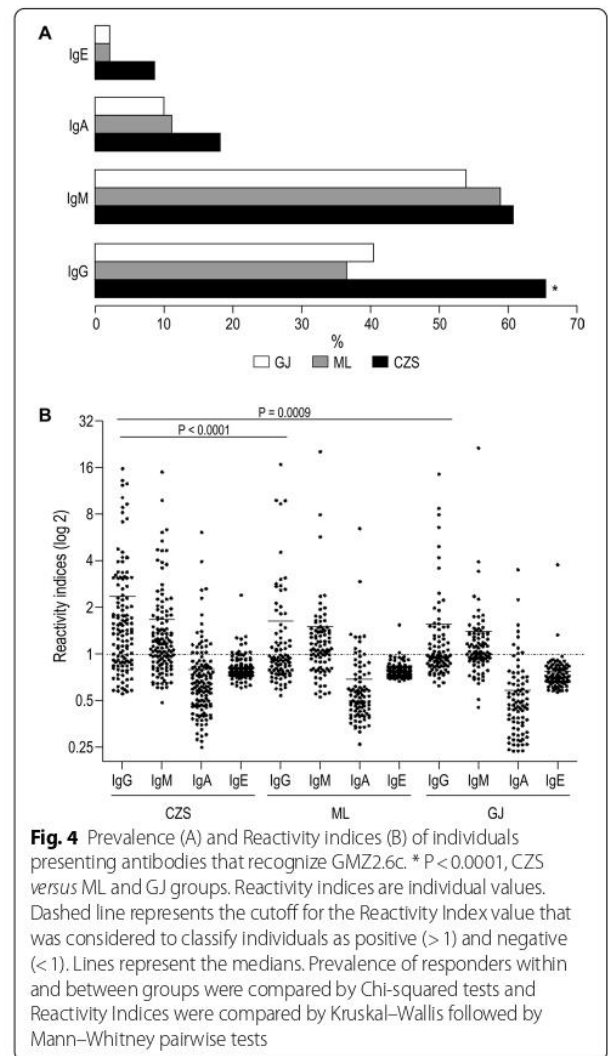


regardless antibody class (whether IgG, IgM, IgA and/or IgE), is shown in Fig. 3. The prevalence of individuals with antibodies against GLURP and Pfs48/45 was similar in CZS, ML and GJ groups. However, the CZS group presented a higher prevalence of anti-MSP-3 positive individuals than the ML and GJ groups ( $P < 0.01$ , CZS versus ML;  $P < 0.0001$ , CZS versus GJ).

No volunteers from the CO group, who reported no previous malaria episodes, had antibodies against GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, or Pfs48/45. Likewise, none of the 40 Rio-controls, with no history of malaria or previous travel to malaria transmission areas, had detectable antibodies to GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, or Pfs48/45.

The prevalence of individuals with IgG, IgM, IgA, and IgE anti-GMZ2.6c antibodies in CZS, ML, and GJ groups is shown in Fig. 4a. A higher frequency of IgG antibody positive individuals was observed in CZS than in ML and GJ groups ( $P < 0.0001$ , for both). Not only the frequency but also the levels of anti-GMZ2.6c IgG antibodies were higher in the CZS group (Fig. 4b). Although a high prevalence of individuals with anti-GMZ2.6c IgM antibodies has been observed, no difference was found when comparing the different groups. In contrast, anti-GMZ2.6c IgA and IgE antibodies were uncommon.

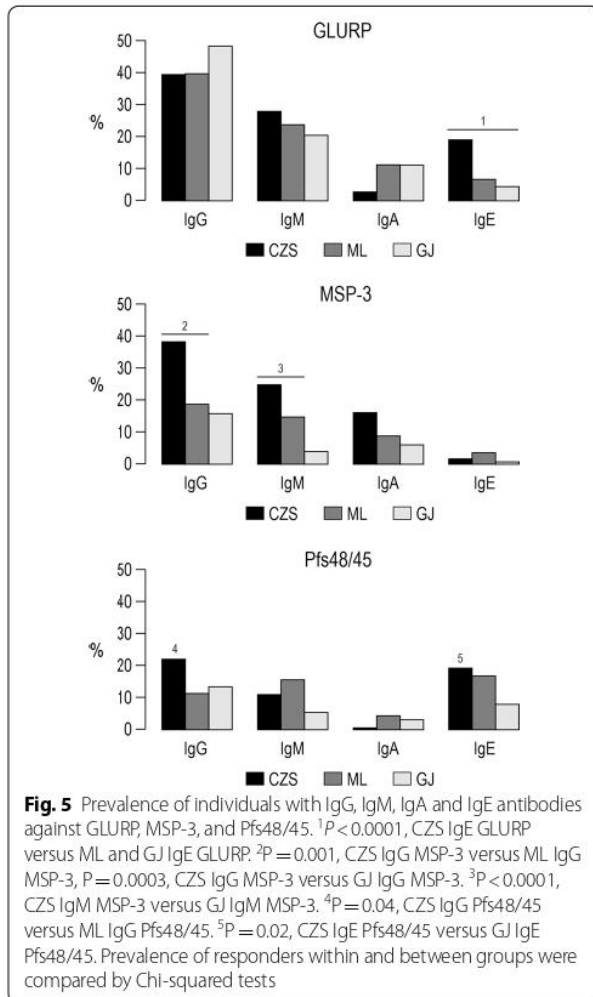
As showed in Fig. 5, the prevalence of individuals with IgG, IgM, and IgA antibodies against GLURP were similar in the three studied groups, except for IgE antibodies against GLURP that were more prevalent in CZS than in ML and GJ groups ( $P < 0.0001$ , for both). Similarly, the CZS group showed a higher prevalence of individuals with IgG against MSP-3 than ML and GJ groups and IgM antibodies against MSP-3 than GJ group (IgG:  $P = 0.001$ , CZS versus ML;  $P = 0.0003$ , CZS versus GJ. IgM:  $P < 0.0001$  CZS versus GJ). For Pfs48/45, IgG antibodies were more prevalent in CZS than in the ML group



( $P = 0.04$ ), while IgE antibodies were more prevalent in CZS than in the GJ group ( $P = 0.02$ ). The Reactivity Indices of IgG, IgM, IgA and IgE against GLURP, MSP-3 and Pfs48/45 were similar when comparing the CZS, ML and GJ groups (Fig. 6).

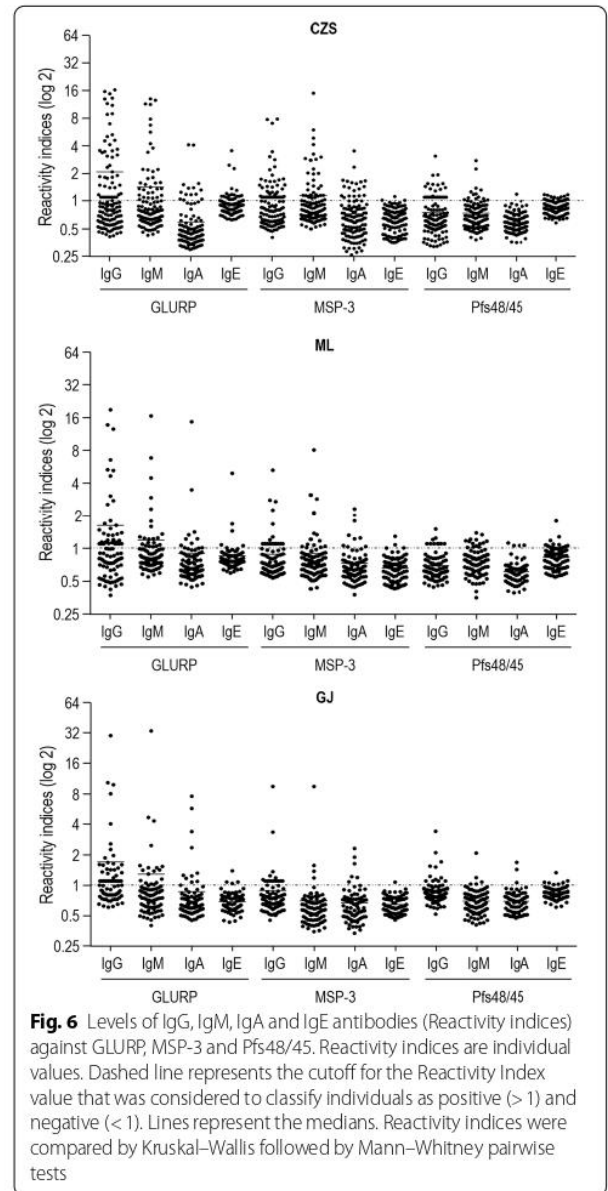
#### Prevalence of individuals presenting IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 antibodies to GMZ2.6c and to its GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 components, in CZS, ML, and GJ groups

The analyses of the IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 antibodies were performed in all samples with detectable IgG antibodies. Anti-GMZ2.6c antibodies were mainly of cytophilic subclass in all study groups ( $P < 0.0001$ , CZS and GJ, IgG1 versus IgG2 and IgG4;  $P = 0.01$ , ML IgG1 versus IgG2;  $P < 0.001$ , ML IgG1 versus IgG4;  $P < 0.0001$ , CZS and GJ IgG3 versus IgG2 and IgG4;  $P = 0.01$ , ML IgG3

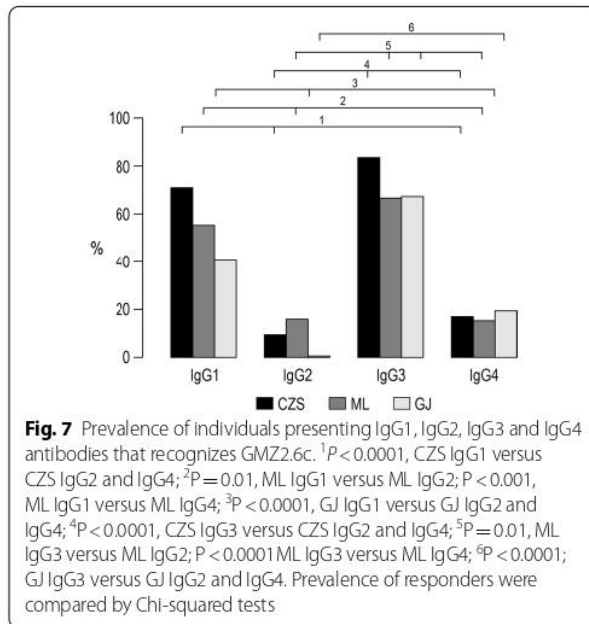


versus IgG2;  $P < 0.0001$  ML IgG3 versus IgG4) (Fig. 7). The CZS group showed a higher frequency of individuals with anti-GM22.6c IgG1 antibodies than the GJ group ( $P = 0.02$ ), while the frequency of individuals with IgG3 antibodies was not different between the groups. CZS and ML groups also showed higher levels of IgG1 and IgG3 than of IgG2 and IgG4 antibodies ( $P < 0.0001$ , CZS IgG1 and IgG3 versus IgG2 and IgG4;  $P = 0.0002$ , ML IgG1 versus IgG2,  $P = 0.01$ , ML IgG1 versus IgG4;  $P < 0.0001$ , ML IgG3 versus IgG2 and IgG4). The GJ group showed higher levels of IgG3 than of IgG2 and IgG4 antibodies ( $P < 0.0001$ ; for all analyses) (Fig. 8).

As showed in Table 2, GLURP induced mainly a cytophilic antibody response in CZS group ( $P < 0.0001$ , IgG1 and IgG3 versus IgG2 and IgG4) whereas, in ML and GJ groups, GLURP induced mainly an IgG1 antibody response (ML:  $P < 0.0001$ , IgG1 versus IgG2, IgG3 and



IgG4; GJ:  $P < 0.0001$ , IgG1 versus IgG2 and IgG4) as did MSP-3 in the CZS group ( $P < 0.0001$ , IgG1 versus IgG2, IgG3, and IgG4). In the three studied groups, the levels of anti-GLURP IgG1 antibodies were higher than the levels of IgG2, IgG3, and IgG4 ( $P < 0.0001$ , for all analyses), as well as the levels of IgG3 antibodies that were higher than the levels of IgG2 and IgG4 in CZS group (CZS:  $P < 0.0001$ , IgG3 versus IgG2 and IgG4). Also, the levels of anti-MSP-3 IgG1 antibodies were higher than those of IgG2, IgG3, and IgG4 in the CZS group ( $P < 0.0001$ , for all analyses) (Fig. 9). No difference was observed in IgG1,



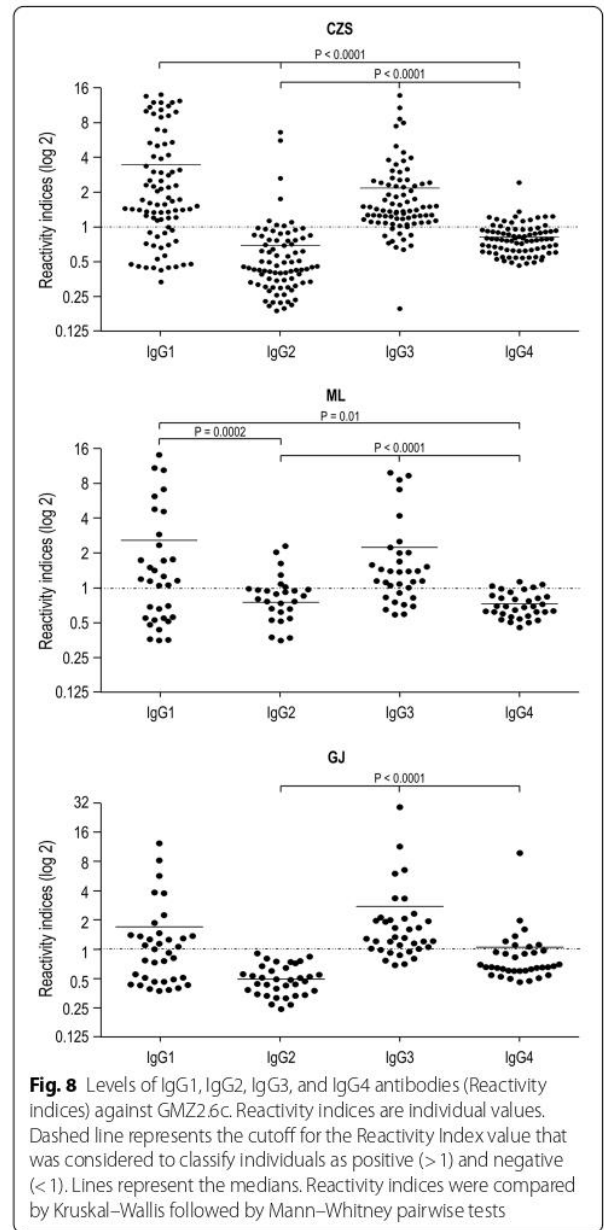
IgG2, IgG3, and IgG4 antibody levels between the CZS, ML, and GJ groups for each of the GMZ2.6c components.

#### Antibody levels in *P. falciparum*-infected and non-infected individuals

The levels of IgG, IgM, IgA, IgE, and IgG subclass antibodies to GMZ2.6c and to its components were compared between 43 *P. falciparum*-infected and 181 non-infected individuals, regardless of whether individuals belong to the CZS, ML or GJ group. Levels of anti-GMZ2.6c and anti-GLURP IgG and IgM antibodies were higher in infected than in non-infected individuals (GMZ2.6c:  $P < 0.0001$ , for both. GLURP:  $P < 0.0001$ , for IgG and  $P < 0.005$  for IgM). Levels of cytophilic (IgG1 and IgG3) antibodies against these antigens were also higher in the *P. falciparum*-infected than in the non-infected (GMZ2.6c:  $P = 0.004$  for IgG1;  $P = 0.002$ , for IgG3. GLURP:  $P < 0.0001$  for IgG1;  $P = 0.02$  for IgG3) group. No difference was observed in antibody levels against MSP-3 and Pfs48/45 between infected and non-infected individuals (Fig. 10).

#### Associations of antibody responses against GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 to personal, clinical and epidemiological data

In order to evaluate the associations of antibody response to GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 to personal, clinical, and epidemiological data, individuals from exposed (CZS, ML, and GJ) groups were all



considered in a single group. Individuals with higher levels (> 75th percentile) of IgG and IgG3 antibodies against GMZ2.6c were older and presented a higher time of residence in malaria-endemic areas than individuals with lower IgG and IgG3 antibody levels (< 75th percentile) (mean  $\pm$  standard deviation:  $40 \pm 18$  versus  $33 \pm 15$ ,  $P = 0.03$ , for IgG;  $47 \pm 17$  versus  $35 \pm 16$ ,  $P = 0.0002$ , for IgG3) (Fig. 11). IgG anti-GMZ2.6c antibody levels were negatively correlated ( $P = 0.01$ ;  $r = -0.557$ ) to *P. falciparum* parasitaemia and positively correlated ( $P = 0.02$ ;

**Table 2** Prevalence of individuals presenting IgG subclass that recognizes GMZ2.6c components in studied groups

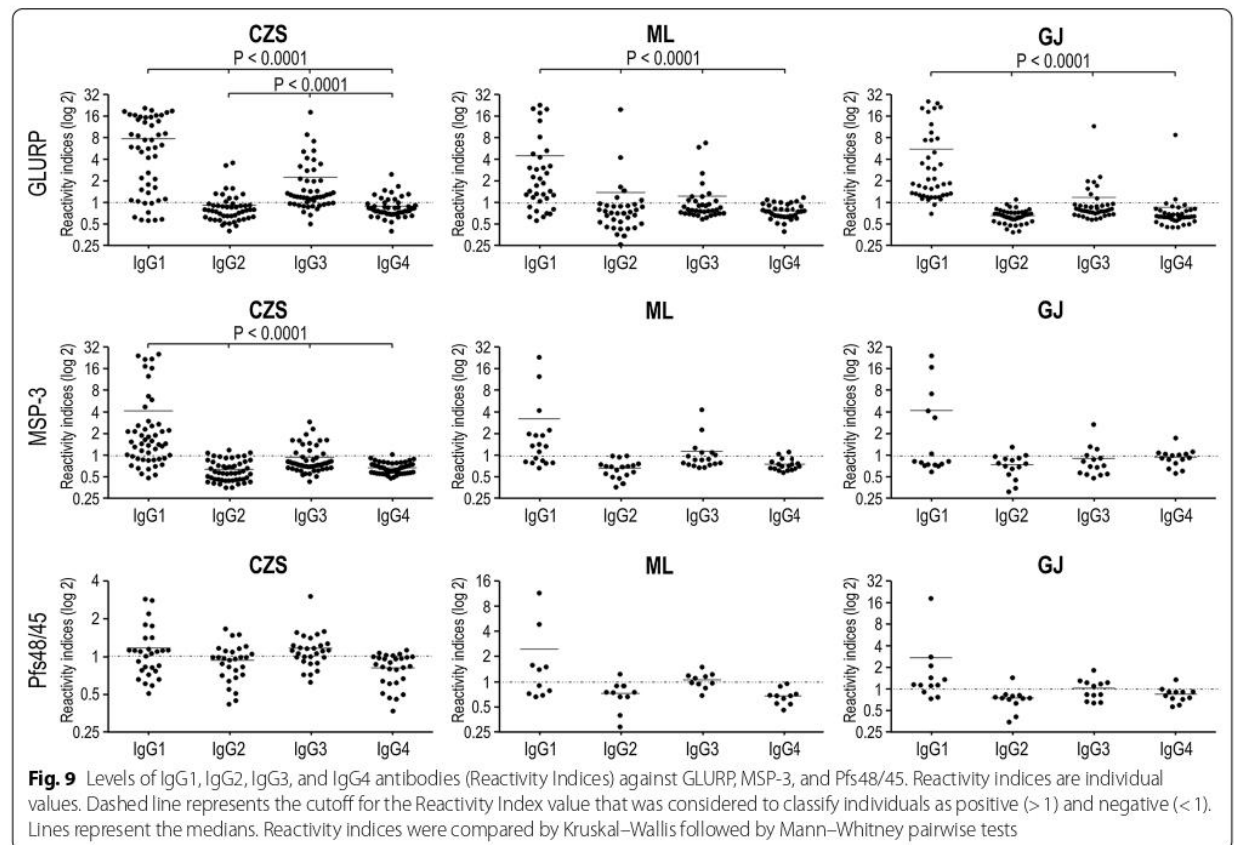
Groups	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
GLURP				
CZS	40/46* (87%)	10/46 (21,7%)	33/46* (71,7%)	10/46 (21,7%)
ML	30/34** (88,2%)	7/34 (20,6%)	12/34 (35,3%)	6/34 (21,7%)
GJ	23/24*** (95,8%)	1/24 (4,2%)	9/24 (37,5%)	2/24 (8,3%)
MSP-3				
CZS	28/31**** (90,3%)	0/31 (0%)	8/31 (25,8%)	0/31 (0%)
ML	6/7	0/7	3/7	0/7
GJ	5/5	1/5	4/5	2/5
Pfs48/45				
CZS	2/2	0/2	0/2	1/2
ML	2/2	0/2	0/2	0/2
GJ	3/7	1/7	3/7	4/7

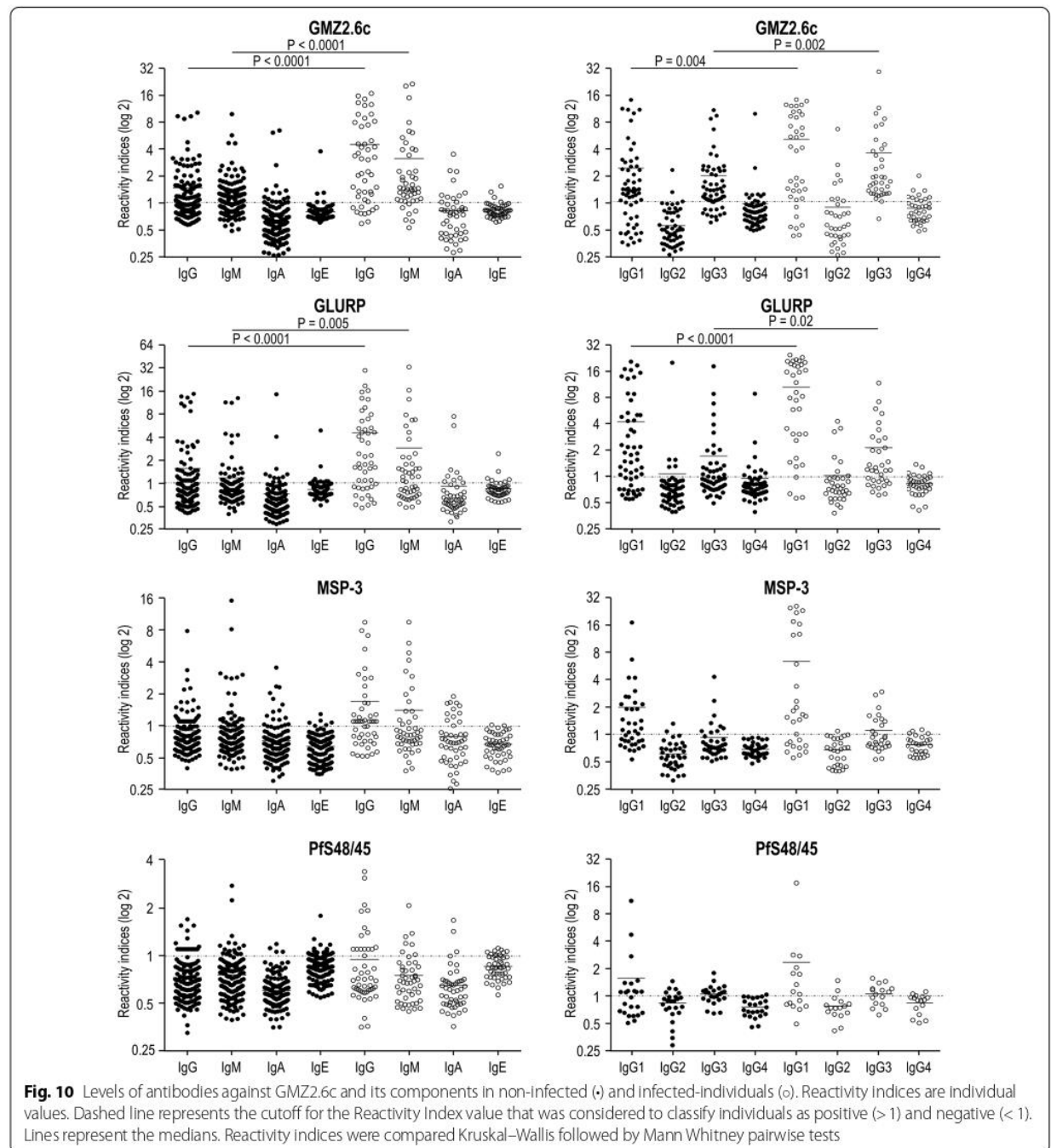
\*  $P < 0.0001$ , IgG1 and IgG3 versus IgG2 and IgG4. \*\*  $P < 0.0001$ , IgG1 versus IgG2, IgG3 and IgG4. \*\*\*  $P < 0.0001$ , IgG1 versus IgG2 and IgG4. \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , IgG1 versus IgG2, IgG3 and IgG4. Only the IgG positive samples were tested for subclasses. Prevalence of responders within and between Groups were compared by Chi-squared tests

$r = 0.1349$ ) with the number of previous malaria infections. Levels of anti-GMZ2.6c IgG3 antibodies were also negatively associated ( $P = 0.02$ ;  $r = -0.3007$ ) to parasitaemia. Individuals with higher levels (>75th percentile) of anti-GLURP IgG3 antibodies were also older and presented a higher time of residence in the malaria-endemic areas (mean  $\pm$  standard deviation:  $46 \pm 15$  versus  $36 \pm 16$ ,  $P = 0.02$ ) (Fig. 11), but did not show different levels of parasitaemia when compared to those of low IgG3 antibody levels. No association was observed between antibody response to MSP-3 and Pfs48/45 and age, gender, time of exposure, presence of symptoms, number of previous malaria episodes, time elapsed since the last malaria episode and current or last infecting plasmodial species.

**Discussion**

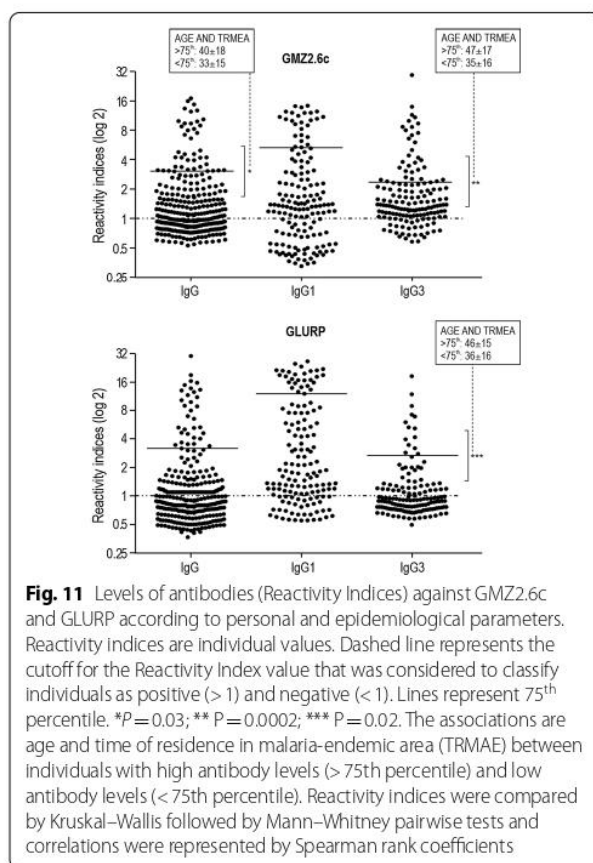
Given the complexity of the life cycle and of the parasite-host interactions, as well as the extensive parasitic genetic variability, and the mechanisms it uses to evade the host immune response, an ideal malaria vaccine should be directed against antigens expressed in different development stages of the *Plasmodium*. In this sense, the recombinant GMZ2.6c protein has shown to





be a promising multi-stage anti-malarial vaccine candidate. In this work, the antibody response profiles to the recombinant *Plasmodium falciparum* GMZ2.6c vaccine candidate in individuals living in Brazilian malaria-endemic areas, with different levels of transmission, was evaluated. The humoral response against

the GMZ2.6c protein and its fragments, GLURP, MSP-3, and Pfs48/45, was assessed in individuals living in three cities of the Brazilian Amazon: Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima, in the state of Acre, and Guajará, in the state of Amazonas.



Individuals were not differently distributed by sex, age, origin and previous exposure to malaria in Cruzeiro do Sul (CZS), Mâncio Lima (ML), and Guajará (GJ), although individuals from ML have reported a higher number of previous infections, even though ML is a highly endemic city like CZS. Most of the individuals reported previous infections by both *P. falciparum* and *P. vivax*, but *P. vivax* was the most prevalent infecting plasmodial species, reflecting the current malaria scenario in Brazil, where *P. vivax* is responsible for 89% of infections [39].

Most individuals from CZS, ML, and GJ had anti-GMZ2.6c antibodies, regardless of the immunoglobulin class, indicating that GMZ2.6c is widely recognized for naturally acquired antibodies from resident individuals. The antigenicity of GMZ2.6c seems to be independent of the endemicity levels, since the prevalence of individuals with antibodies that recognized GMZ2.6c was similar in the three study sites, with different endemicity levels.

Sixty-eight individuals (21 in CZS, 23 in ML, and 24 in GJ) had no antibodies that recognized GMZ2.6c (nor its individual fragments). The non-detection of anti-GMZ2.6c antibodies in these individuals could be

associated to the absence of a previous contact with the parasite. However, of these, only 4 reported no previous malaria episodes and 10 reported only previous infection by *P. vivax*. The other individuals reported at least one *P. falciparum* infection. The non-detection of these antibodies could also be related to functional exhaustion among T and B cell subsets, well-described in viral infections [40–43] and equally considered for malaria [44–49]. Besides atypical memory B cells and the exhausted CD4 T cells, the absence of specific antibodies may depend on other factors, such as *P. falciparum* genetic polymorphisms, intensity of infection, coinfections, malnutrition, or human host genetic factors.

Clinical trials in naive subjects and in individuals naturally exposed to malaria in Africa to evaluate the safety and immunogenicity of GMZ2 showed a more potent response against GMZ2 when compared to its individual components [27, 28]. In the present study, a similar observation was made, where there was a higher prevalence of individuals with antibodies and higher levels of anti-GMZ2.6c antibodies, by comparing to its individual components, which may suggest an additive effect of GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 when inserted in a same construct, and that GMZ2.6c may be a more promising anti-malarial vaccine candidate than its individual components. The data obtained in the present study corroborate a previous report of higher prevalence of individuals with antibodies anti-GMZ2 antibodies when compared to those against GLURP and MSP-3, in individuals naturally exposed to malaria in Ethiopia [32]. However, the possibility that the data observed in the present study are a simple reflex of the sum of the antibody response directed towards each of the antigens that make up GMZ2.6c, sufficient for individuals with antibody levels below the detection limit to exceed the threshold, cannot be excluded. Clarifying this point and evaluating the possibility of a synergistic effect of anti-GLURP, and anti-MSP-3 antibodies are ongoing in the laboratory.

Independent studies have evaluated the potential of humoral immune response against GLURP and MSP-3 in conferring clinical immunity to malaria in African endemic areas with different transmission intensities. A wide variety of results regarding the natural immunogenicity of GLURP and MSP-3 was observed. Some studies have reported the higher immunogenicity of MSP-3 when compared to GLURP-R0 [50, 51], while GLURP was more immunogenic in other studies [25, 52, 53]. However, in all of them, both MSP-3 and GLURP have been considered as endowed with greater immunogenicity properties. In the present study, both GLURP and MSP-3 have been shown to be widely recognized by antibodies, mainly in high-endemicity areas of CZS and ML.



In the present study, the prevalence of individuals with anti-Pfs48/45 antibodies ranged from 24 to 40%. These prevalences are lower than those (74.7%) observed in the Central Region of Ghana for the same Pfs48/45 construct (Pfs48/45.6c) (37), possibly reflecting differences in exposure to gametocytes as previously reported in a longitudinal study in a hypo-endemic area in Tanzania [54].

In this work, many individuals from the CZS, ML and GJ groups had IgG and IgM antibodies recognizing GMZ2.6c, contrasting with an uncommon IgA and IgE specific response. The data presented here also showed that anti-GMZ2.6c IgG antibodies were more frequent and present higher levels in the CZS group when compared to the ML and GJ groups. It is widely accepted that IgG antibodies are the main mediators of protection against clinical malaria [10, 55], and its important presence mainly in the CZS group may be reflecting a higher degree of anti-parasitic immunity. The higher prevalence of individuals with antibodies and higher antibody levels in the CZS group may be due to the genetic background of the study population since allelic forms of the Major Histocompatibility Complex (HLA) antigens may influence the host's ability to mount a naturally acquired humoral immune response [23, 56–58]. Additionally, the genetic variability of *P. falciparum* isolates circulating at variable levels in the Brazilian Amazonian Region may explain this difference in immune response in the CZS group, since genetic polymorphisms in B epitopes may influence the immunological properties of the antigen [59]. This remains to be elucidated.

The role of IgE antibodies in the outcome of malaria infection remains controversial and poorly understood. The levels of *P. falciparum*-specific IgE are proposed to be associated with protection as well as to participate in the pathogenesis of malaria [60–63]. Thus, the IgE antibody response against GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 and Pfs48/45 was also assessed. The prevalence of individuals with anti-GMZ2.6c IgE antibodies and the levels of these antibodies were low (2.3 to 8.9%) in the three studied groups. However, a relatively high prevalence of individuals with IgE antibodies against GLURP and Pfs48/45 was verified, mainly in CZS. Some studies have reported that individual anti-*Anopheles* salivary gland IgE level is positively correlated with the antiplasmodial IgE antibody levels, and a hypothesis proposes that, during *Anopheles* bite, the injection of saliva containing pharmacologically active proteins and peptides predisposes individuals to the development of an antiplasmodial IgE response [64, 65].

It has been proposed that cytophilic IgG1 and IgG3 isotypes are more correlated with protective responses than the IgG2 and IgG4 (non-cytophilic) antibodies [10, 55]. Here, the profile of the IgG subclass against

the GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 and Pfs48/45 proteins was evaluated in all samples presenting IgG antibodies to the studied proteins. Naturally malaria-exposed individuals predominantly had anti-GMZ2.6c IgG1 and IgG3 cytophilic antibodies, an important fact considering that it has been proposed that not only the acquisition of anti-malaria protective immunity would result from a delicate balance between cytophilic/non cytophilic antibodies, but also that IgG2 and IgG4 non-cytophilic antibodies with the same specificity could block the effector mechanisms of the cytophilic ones [18, 66, 67]. Indeed, the interaction between cytophilic antibodies and Fc receptors on phagocytic cells can lead to cellular activation and to triggering of effector functions such as phagocytosis, cytokine and chemokine production, cytotoxicity, and the generation of reactive oxygen and nitrogen species [68]. Cytophilic antibodies may also mediate parasite death in cooperation with mononuclear cells through the antibody-dependent cellular inhibition mechanism (ADCI) besides the opsonization of *P. falciparum* merozoites [10, 69, 70].

Studies have shown that the inherent characteristics of plasmodial antigens can influence the molecular events that lead to the preferential induction of different IgG subclasses. The presence of both repetitive and polymorphic amino acid sequences predominantly induces an IgG3 response, whereas the absence of such polymorphic repeats predominantly induces IgG1 responses. Polymorphic antigens with no repetitive sequence induce an IgG1 + IgG3 response, with the predominance of IgG3, whereas conserved repetitive antigens tend to induce IgG1 or IgG1 + IgG3 responses [71, 72]. The data here obtained showed a predominantly cytophilic antibody response (IgG1 + IgG3) to GLURP, whereas MSP-3 induced a predominantly IgG1 response. These results may be due to the conserved nonrepetitive characteristic of GLURP contrasting with the repetitive nature and relatively more polymorphic of MSP-3 [73–75]. However, factors such as cumulative malaria exposure, age of individuals, HLA and the polymorphism of the FC $\gamma$  receptor have also been shown to influence the distribution of IgG subclass against plasmodial antigens [71, 76]. In addition, specific combinations of cytokines and B-cell activators have shown to induce the switch to certain classes and subclass in experimental models [77]. In vitro experiments with human and murine B cells have identified cytokines that selectively induce the synthesis of a particular immunoglobulin class by the stimulation of DNA rearrangement and selective transcription of CH genes [78–81].

IgG and IgM antibodies levels against GMZ2.6c and GLURP were higher in parasitized individuals when

compared to non-parasitized subjects. This result may reflect the stimulation of the immune system leading to the production of antiplasmodial antibodies, including anti-GLURP antibodies, due to infection. This booster, in response to infection, seems to induce a predominantly IgG1 and IgG3 antibodies that recognize GMZ2.6c and GLURP.

Classically, levels of antibodies against several plasmodial antigens seem to be associated with age and time of exposure to malaria in endemic regions [23, 82–88]. In the present study, individuals with higher levels of IgG and IgG3 anti-GMZ2.6c (>75th percentile) antibodies were older and presented a longer time of residence in malaria-endemic areas than individuals with levels of antibody below the 75th percentile. Negative correlations were observed between parasitaemia and levels of IgG and IgG3, and a positive one was registered between the number of previous malaria infections and IgG antibodies against GMZ2.6c. Taken together, these data indicate that the prevalence of individuals with antibodies that recognize GMZ2.6c as well as the anti-GMZ2.6c antibody levels increase with exposure to infection and that these antibodies may contribute to parasite immunity. Considering the cross-sectional design of this work, additional studies are needed to confirm these findings. Moreover, the evaluation of the functional role of antibodies against MSP-3 and GLURP in inhibiting the *in vitro* growth of *P. falciparum* and of the anti-Pfs48/45 antibodies in inhibiting fertilization has been currently conducted in the laboratory and could also help to clarify this issue.

The analysis of the antibody response against the individual (GLURP, MSP-3 and Pfs48/45) proteins constituting the GMZ2.6c vaccine candidate did not provide evidence of a possible protective role of these antibodies, since no relationship was verified between prevalence or levels of specific antibodies and the presence or absence of parasites in the blood, the presence or absence of symptoms at the time of collection, parasitaemia, number of previous malaria episodes, time elapsed since the last malaria episode, current or last infecting plasmodial species. Associations between high anti-GLURP and anti-MSP3 antibody levels and low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana have however been reported [33].

Taken together, the data presented here showed that GMZ2.6c protein is widely recognized by naturally acquired antibodies from individuals living in endemic areas of Brazil with different levels of transmission. The higher prevalence of individuals with antibodies that recognize GMZ2.6c and the higher levels of these antibodies when compared to their individual components may suggest an additive effect of GLURP, MSP-3, and Pfs48/45

when inserted in a same construct. Also, anti-GMZ2.6c antibodies seem to increase with exposure to malaria infection and may contribute to parasite immunity. These data highlight the importance of GMZ2.6c as a candidate for an anti-malarial vaccine. Additional studies in other endemic areas, with populations with different genetic backgrounds, besides the evaluation of the functional role of anti-GMZ2.6c antibodies, are important to confirm the potential of GMZ2.6c as an anti-malarial vaccine.

### Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12936-021-04020-6>.

**Additional file 1: Table S1.** Antigens and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay antibody assays.

### Acknowledgements

We are grateful to all individuals who agreed to participate in this study for their cooperation and generous donation of blood samples, which made this study possible, and to the Endemic Diseases Coordination of the cities of Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, and Guajará for the support during the field work. We are also thankful to Marcelo Urbano Ferreira for providing facilities in the malaria endemic areas and to Heloisa Maria Nogueira Diniz for helping with figures.

### Authors' contributions

LRP-R conceived and designed the study. BOB and ABL performed the experiments. BOB and LRP-R analysed and interpreted the data. MR-A reviewed the statistical analyses. JHMS assisted in the study design. BOB, ABL, EKPR, CB-J, PRRT, RMS, JCL-J and LRP-R recruited subjects, collected and processed the samples, and supported the fieldwork. MT, SKS and LEA designed and expressed recombinant proteins. BOB wrote the manuscript. EKPR, PRRT, JHMS, MT, MR-A, JCL-J and CTD-R reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Funding

This work was supported by Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/INOVA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (Pronex), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. CTD-R is recipient of a Productivity Research Fellowship from CNPq, Brazil, and is a “Cientista do Nosso Estado” recognized by the FAPERJ, Rio de Janeiro, Brazil.

### Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

The study protocol was reviewed and approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248), which included obtaining the following patients' written consents for research use of their blood samples. Written informed consent was obtained from all adult donors or from donor's parents in the cases of children. All the procedures adopted in this study fully complied with specific federal permits issued by the Brazilian Ministry of Health.

#### Consent for publication

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Malária, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup>Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária, Fiocruz, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Bioinformática, Fiocruz, Ceará, Brazil. <sup>4</sup>Centre for Medical Parasitology at Department of International Health, Immunology and Microbiology, University of Copenhagen and Department of Infectious Diseases, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark. <sup>5</sup>Immunology Department, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, Accra, Ghana. <sup>6</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica em DST e AIDS, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>7</sup>Laboratório de Doenças Infecciosas na Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Acre, Acre, Brazil. <sup>8</sup>Laboratório de Imunoparasitologia, IOC, Rio de Janeiro, Fiocruz, Brazil.

Received: 8 July 2021 Accepted: 9 December 2021

Published online: 04 January 2022

**References**

- WHO. World Malaria Report. Geneva: World Health Organization; 2019. <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>. Accessed 2 Jan 2020.
- Noedl H, Se Y, Schaefer K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med*. 2008;359:2619–20.
- Leang R, Taylor WR, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, et al. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in Western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:4719–26.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyoo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009;361:1714.
- Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NP, Socheat D, et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol*. 2010;9:272–80.
- Vreden SG, Jitan JK, Bansie RD, Adhin MR. Evidence of an incidence of day 3 parasitemia in Suriname: an indicator of the emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemether. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:968–73.
- Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, et al. Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. *Elife*. 2020;9:e51015.
- Matuschewski K. Vaccines against malaria – still a long way to go. *FEBS J*. 2017;284:2560–8.
- 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;34:2207–15.
- Theisen M, Adu B, Mordmüller B, Singh S. The GMZ2 malaria vaccine: from concept to efficacy in humans. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16:907–17.
- Quintana MDP, Chng J, Zandian A, Imam M, Hulthenby K, Theisen M, et al. SURGE complex of *Plasmodium falciparum* in the rophtry-neck (SURFIN4.2-RON4-GLURP) contributes to merozoite invasion. *PLoS ONE*. 2018;13:e0201669.
- Imam M, Singh S, Kaushik NK, Chauhan VS. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3: oligomerization, self-assembly, and heme complex formation. *J Biol Chem*. 2014;289:3856–68.
- Borre MB, Dziegiel M, Hogg B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, et al. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;49:119–31.
- McColl DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Mol Biochem Parasitol*. 1997;90:21–31.
- van Dijk MR, Janse CJ, Thompson J, Waters AP, Braks JA, Dodemont HJ, et al. A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell*. 2001;104:153–64.
- Graves PM, Carters R, Burkot TR, Quakyl IA, Kumar N. Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunol*. 1988;10:209–18.
- Ong SL, Zhang KY, Eida SJ, Graves PM, Dow C, Looker M, et al. The primary antibody response of malaria patients to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens which are potential transmission blocking vaccine candidates. *Parasite Immunol*. 1990;12:447–56.
- 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 *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood*. 1994;84:1594–602.
- Roefen W, Mulder B, Teelen K, Bolmer M, Eling W, Targett GA, et al. Association between anti-Pfs48/45 reactivity and P. falciparum transmission-blocking activity in sera from Cameroon. *Parasite Immunol*. 1996;18:103–9.
- Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, Danielsen S, et al. The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth *in vitro*. *Infect Immun*. 1998;66:11–7.
- 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;68:2617–20.
- Theisen M, Soe S, Jessing SG, Okkels LM, Danielsen S, Oeuvray C, et al. Identification of a major B-cell epitope of the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing. *Vaccine*. 2000;19:204–12.
- Pratt-Riccio LR, Lima-Junior JC, Carvalho LJ, 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;73:1096–103.
- Bousema JT, Drakeley CJ, Kihonda J, Hendriks JCM, Akim NIJ, Roefen W, et al. A longitudinal study of immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens in Tanzanian adults. *Parasite Immunol*. 2007;29:309–17.
- Pratt-Riccio LR, Bianco-Junior C, Totino PRR, Perce-da-Silva DS, 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.
- Baumann A, Magris MM, Urbaz 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;11:46.
- Esen M, Kreamsner 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;27:6862–8.
- 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 Lambaré. *Gabon Vaccine*. 2010;28:6698–703.
- Bélard 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:e22525.
- 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;208:479–88.
- 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;34:4536–42.
- 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.
- Amoah LE, Nuvor SV, Obboh EK, Acquah FK, Asare K, Singh SK, et al. Natural antibody responses to *Plasmodium falciparum* MSP3 and GLURP(R0)

- antigens are associated with low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana. *Parasit Vectors*. 2017;10:395.
34. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Malária. 2020. [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/03/boletim\\_especial\\_malaria\\_1dez20\\_final.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/03/boletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf). Accessed 21 Jan 2021.
  35. Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol Biol*. 1996;50:263–91.
  36. Ministry of Health of Brazil. Guide to malaria treatment in Brazil. 2020. [http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/guia\\_tratamento\\_malaria\\_brasil.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/guia_tratamento_malaria_brasil.pdf). Accessed 20 Nov 2020.
  37. Acquah FK, Obboh EK, Asare K, Boampong JN, Nuvor SV, Singh SK, et al. Antibody responses to two new *Lactococcus lactis*-produced recombinant Pfs48/45 and Pfs230 proteins increase with age in malaria patients living in the Central Region of Ghana. *Malar J*. 2017;16:306.
  38. Singh SK, Tiendrebego RW, Chourasia BK, Kana IH, Singh S, Theisen M. *Lactococcus lactis* provides an efficient platform for production of disulfide-rich recombinant proteins from *Plasmodium falciparum*. *Microb Cell Fact*. 2018;17:55.
  39. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resumo Epidemiológico por Local de Notificação. 2019. <http://portalsaude.saude.gov.br>. Accessed 28 Jan 2020.
  40. El-Far M, Halwani R, Said E, Trautmann L, Doroudchi M, Janbazian L, et al. T-cell Exhaustion in HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2008;5:13–9.
  41. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:235–45.
  42. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010;129:474–81.
  43. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12:492–9.
  44. Weiss GE, Crompton PD, Li S, Walsh LA, Moir S, Traore B, et al. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *J Immunol*. 2009;183:2176–82.
  45. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtable D, et al. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000912.
  46. Weiss GE, Clark EH, Li S, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, et al. A positive correlation between atypical memory B cells and *Plasmodium falciparum* transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. *PLoS ONE*. 2011;6:e15983.
  47. Illingworth J, Butler NS, Roetynck S, Mwacharo J, Pierce SK, Bejon P, et al. Chronic exposure to *Plasmodium falciparum* is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. *J Immunol*. 2013;190:1038–47.
  48. Shankar EM, Vignesh R, Dash AP. Recent advances on T-cell exhaustion in malaria infection. *Med Microbiol Immunol*. 2018;207:167–74.
  49. Holla P, Ambegaonkar A, Sohn H, Pierce SK. Exhaustion may not be in the human B cell vocabulary, at least not in malaria. *Immunol Rev*. 2019;292:139–48.
  50. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Khin-Saw A, 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. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.247-252.2004>.
  51. 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.
  52. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, et al. Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso. *West Africa Infect Immun*. 2008;76:759–66.
  53. Courtin D, Oesterholt M, Huismans 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;4:e7590.
  54. Bousema T, Roeffen W, Meijerink H, Mwerinde H, Mwakalinga S, van Gemert GJ, et al. The dynamics of naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs230 & Pfs48/45 in a low endemic area in Tanzania. *PLoS ONE*. 2010;5:e14114.
  55. Dobaño C, Santano R, Vidal M, Jiménez A, Jairoce C, Ubillos I, et al. Differential patterns of IgG subclass responses to *Plasmodium falciparum* antigens in relation to malaria protection and RTS. S vaccination *Front Immunol*. 2019;10:439.
  56. Banic DM, Goldberg AC, Pratt-Riccio LR, Oliveira-Ferreira J, Santos F, Gras-Masse H, et al. Human leukocyte antigen class II control of the immune response to p126-derived amino terminal peptide from *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:509–15.
  57. Lima-Junior J, Pratt-Riccio LR. Major histocompatibility complex and malaria: focus on *Plasmodium vivax* infection. *Front Immunol*. 2016;7:13.
  58. Pratt-Riccio LR, Perce-da-Silva DS, Lima-Junior JC, Riccio EKP, Ribeiro-Alves M, Santos F, et al. Synthetic antigens derived from *Plasmodium falciparum* sporozoite, liver, and blood stages: naturally acquired immune response and human leukocyte antigen associations in individuals living in a Brazilian endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97:1581–92.
  59. Pratt-Riccio LR, Perce-da-Silva DS, Lima-Junior JC, Theisen M, Santos F, Daniel-Ribeiro CT, et al. Genetic polymorphisms in the glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* field isolates from a malaria-endemic area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:523–8.
  60. Elghazali G, Perlmann H, Rutta AS, Perlmann P, Troye-Blomberg M. Elevated plasma levels of IgE in *Plasmodium falciparum*-primed individuals reflect an increased ratio of IL-4 to interferon-gamma (IFN $\gamma$ )-producing cells. *Clin Exp Immunol*. 1997;109:84–9.
  61. Perlmann P, Perlmann H, Flyg BW, Hagstedt M, Elghazali G, Worku S, et al. Immunoglobulin E, a pathogenic factor in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. 1997;65:116.
  62. Perlmann P, Perlmann H, Elghazali G, Blomberg MT. IgE and tumor necrosis factor in malaria infection. *Immunol Lett*. 1999;65:29–33.
  63. Berczky S, Montgomery SM, Troye-Blomberg M, Rooth I, Shaw MA, Färnert A. Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria. *Int J Parasitol*. 2004;34:935–42.
  64. Zeidner NS, Higgs S, Happ CM, Beaty BJ, Miller BR. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite Immunol*. 1999;21:35–44.
  65. Lawaly R, Konate L, Marrama L, Dia I, Diallo D, Sarr FD, et al. Impact of mosquito bites on asexual parasite density and gametocyte prevalence in asymptomatic chronic *Plasmodium falciparum* infections and correlation with IgE and IgG titers. *Infect Immun*. 2012;80:2240–6.
  66. 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.
  67. Metzger WG, Okenu DMN, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasit Immunol*. 2003;25:307–12.
  68. Ortega E, Soto-Cruz I. Early biochemical events in leukocyte activation through receptors for IgG. *Signal Transduct*. 2007;7:415–26.
  69. Druilhe P, Pérignon JL. Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans. *Immunol Lett*. 1994;41:115–20.
  70. Bouharoun-Tayoun H, Oeuway C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 1995;182:409–18.
  71. Scopel KKG, Fontes CJF, Ferreira MU, Braga EM. Factors associated with immunoglobulin G subclass polarization in naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins: a cross-sectional survey in Brazilian Amazonia. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:810–3.
  72. Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SLR, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WMM, et al. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect Immun*. 2006;74:257–64.
  73. McColl DJ, Silva A, Foley M, Kun JF, Favaloro JM, Thompson JK, et al. Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;68:53–67.
  74. Huber W, Felger I, Matile H, Joachim Lipps H, Steiger S, Beck H-P. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 31. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;87:231–4.

75. Pattaradilokrat S, Sawaswong V, Simpalipan P, Kaewthamasorn M, Siripoon N, Harnyuttanakom P. Genetic diversity of the merozoite surface protein-3 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Malar J*. 2016;15:517.
76. Aucan C, Traoré Y, Fumoux F, Rihet P. Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Burkina Faso. *Infect Immun*. 2001;69:996–1001.
77. Coffman RL, Leberman DA, Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol*. 1993;54:229–70.
78. Isakson BYPC, Vitetta ES. T cell-derived B cell differentiation factor(s) Effect on the isotype switch of murine B cells. *J Exp Med*. 1982;155(3):734–48. <https://doi.org/10.1084/jem.155.3.734>.
79. Snapper CM, Finkelman FD. Rapid loss of IgM expression by normal murine B cells undergoing IgG1 and IgE class switching after *in vivo* immunization. *J Immunol*. 1990;145:3654–60.
80. Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:199–205.
81. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:165–96.
82. 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;173:765–9.
83. 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;58:211–9.
84. Banic DM, 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 aminoterminal repeat in malaria-infected humans. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:768–74.
85. Roussilhon C, Oeuvray C, Muller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape JF, et al. Longterm clinical protection from *falciparum* malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Med*. 2007;4:e320.
86. John CC, Tande AJ, Moormann AM, Sumba PO, Lanar DE, Min XM, et al. Antibodies to pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children. *J Infect Dis*. 2008;197:519–26.
87. 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 Health*. 2008;13:229–37.
88. Osier FH, 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;76:2240–8.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)











### **3.2. Artigo 2 – B-cell epitope mapping of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate GMZ2.6c in naturally exposed population of the Brazilian Amazon**

A GMZ2.6c é uma proteína quimérica candidata a vacina multiestágio contra *Plasmodium falciparum* que contém o fragmento de estágio sexuado *Pfs48/45-6C* geneticamente fusionado a GMZ2, uma construção vacinal de fase assexuada que consiste na região N-terminal da Proteína Rica em Glutamato (GLURP) e C-terminal da Proteína 3 de Superfície de Merozoíto (MSP-3). Estudos anteriores mostraram que a GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos de indivíduos brasileiros expostos a malária e que seus componentes são imunogênicos após infecção natural por *P. falciparum*. Além disso, anticorpos anti-GMZ2.6c aumentam com a exposição a infecção e podem contribuir com a imunidade antiparasitária. Portanto, identificar epítomos de proteínas reconhecidas por anticorpos pode ser uma importante ferramenta para compreender a imunidade protetora. Nesse trabalho, nós identificamos e validamos epítomos de células B imunodominantes da GMZ2.6c em indivíduos expostos a malária residentes em áreas endêmicas da Amazônia Brasileira. Anticorpos IgG e subclasses específicos contra epítomos da GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45* foram detectados por ELISA utilizando peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos de células B previamente descritos para a MSP-3 e GLURP ou identificados pelo BepiPred 1.0 para a *Pfs48/45*. Os resultados mostraram que os epítomos imunodominantes foram P11 da GLURP, e MSP-3c e DG210 da MSP-3. As subclasses IgG1 e IgG3 foram preferencialmente induzidas contra os epítomos, corroborando com estudos anteriores de que estas proteínas são alvos de anticorpos citofílicos, importantes para a aquisição da imunidade protetora. A maioria dos indivíduos apresentou anticorpos IgG detectáveis contra *Pfs48/45a* e/ou *Pfs48/45b*, validando a predição de epítomos lineares de células B. A alta frequência e níveis de anticorpos contra diferentes epítomos derivados da GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45* fornece informações adicionais que podem sugerir a relevância da GMZ2.6c como candidata a vacina contra malária.

## Article

# B-Cell Epitope Mapping of the *Plasmodium falciparum* Malaria Vaccine Candidate GMZ2.6c in a Naturally Exposed Population of the Brazilian Amazon

Barbara de Oliveira Baptista <sup>1,2</sup> , Ana Beatriz Lopes de Souza <sup>1,2</sup>, Luana Santos de Oliveira <sup>1,2</sup>, Hugo Amorim dos Santos de Souza <sup>1,2</sup> , Jenifer Peixoto de Barros <sup>1,2</sup>, Lucas Tavares de Queiroz <sup>1,2</sup>, Rodrigo Medeiros de Souza <sup>3</sup> , Linda Eva Amoah <sup>4</sup> , Susheel Kumar Singh <sup>5,6</sup> , Michael Theisen <sup>5,6</sup>, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva <sup>7</sup> , Evelyn Kety Pratt Riccio <sup>1,2</sup>, Paulo Renato Rivas Totino <sup>1,2</sup>, Josué da Costa Lima-Junior <sup>8</sup>, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro <sup>1,2</sup>  and Lilian Rose Pratt-Riccio <sup>1,2,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa em Malária, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil
  - <sup>2</sup> Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária (CPD-Mal), Fiocruz e Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil
  - <sup>3</sup> Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Acre—Campus Floresta (UFAC), Cruzeiro do Sul 69895-000, AC, Brazil
  - <sup>4</sup> Immunology Department, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, Accra P.O. Box LG 25, Ghana
  - <sup>5</sup> Centre for Medical Parasitology, Department of International Health, Immunology and Microbiology, University of Copenhagen, DK-2200 Copenhagen, Denmark
  - <sup>6</sup> Department of Infectious Disease, Copenhagen University Hospital, DK-2200 Copenhagen, Denmark
  - <sup>7</sup> Laboratório de Tecnologia Imunológica, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil
  - <sup>8</sup> Laboratório de Imunoparasitologia, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil
- \* Correspondence: riccio@ioc.fiocruz.br; Tel.: +55-21-3865-8135



**Citation:** Baptista, B.d.O.; Souza, A.B.L.d.; Oliveira, L.S.d.; Souza, H.A.d.S.d.; Barros, J.P.d.; Queiroz, L.T.d.; Souza, R.M.d.; Amoah, L.E.; Singh, S.K.; Theisen, M.; et al. B-Cell Epitope Mapping of the *Plasmodium falciparum* Malaria Vaccine Candidate GMZ2.6c in a Naturally Exposed Population of the Brazilian Amazon. *Vaccines* **2023**, *11*, 446. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020446>

Academic Editor: Jorge H. Leitão

Received: 9 January 2023

Revised: 9 February 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 15 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The GMZ2.6c malaria vaccine candidate is a multi-stage *P. falciparum* chimeric protein that contains a fragment of the sexual-stage *Pfs48/45-6C* protein genetically fused to GMZ2, an asexual-stage vaccine construction consisting of the N-terminal region of the glutamate-rich protein (GLURP) and the C-terminal region of the merozoite surface protein-3 (MSP-3). Previous studies showed that GMZ2.6c is widely recognized by antibodies from Brazilian exposed individuals and that its components are immunogenic in natural infection by *P. falciparum*. In addition, anti-GMZ2.6c antibodies increase with exposure to infection and may contribute to parasite immunity. Therefore, identifying epitopes of proteins recognized by antibodies may be an important tool for understanding protective immunity. Herein, we identify and validate the B-cell epitopes of GMZ2.6c as immunogenic and immunodominant in individuals exposed to malaria living in endemic areas of the Brazilian Amazon. Specific IgG antibodies and subclasses against MSP-3, GLURP, and *Pfs48/45* epitopes were detected by ELISA using synthetic peptides corresponding to B-cell epitopes previously described for MSP-3 and GLURP or identified by BepiPred for *Pfs48/45*. The results showed that the immunodominant epitopes were P11 from GLURP and MSP-3c and DG210 from MSP-3. The IgG1 and IgG3 subclasses were preferentially induced against these epitopes, supporting previous studies that these proteins are targets for cytophilic antibodies, important for the acquisition of protective immunity. Most individuals presented detectable IgG antibodies against *Pfs48/45a* and/or *Pfs48/45b*, validating the prediction of linear B-cell epitopes. The higher frequency and antibody levels against different epitopes from GLURP, MSP-3, and *Pfs48/45* provide additional information that may suggest the relevance of GMZ2.6c as a multi-stage malaria vaccine candidate.

**Keywords:** GMZ2.6c; epitope mapping; antibodies; malaria; *Plasmodium falciparum*; vaccine

## 1. Introduction

Malaria, an infectious disease caused by *Plasmodium* parasites, remains a major public health problem worldwide. In 2021, 247 million cases and 619,000 deaths due to malaria were estimated globally, most of them caused by *P. falciparum* [1]. Despite the remarkable progress in control over the last few years, the emergence of resistant parasites to artemisinin-based combination therapies (ACTs), the first line of treatment for uncomplicated *P. falciparum* malaria in all endemic countries [2–6], and resistance of *Anopheles* to available insecticides [7] highlights the need for an effective vaccine to be implemented, complementing the existing tools. Recently, the World Health Organization (WHO) recommended the widespread use of the RTS,S/AS01 vaccine among children in regions with moderate to high *P. falciparum* transmission [1]. Despite its partial and low efficacy, this vaccine might prevent about 30% of child deaths [8]. However, vaccine candidates with a higher protective efficacy should be developed. Considering the complex life cycle, an ideal malaria vaccine should be directed against antigens expressed in different parasite development stages.

The GMZ2.6c malaria vaccine candidate is a multi-stage *P. falciparum* chimeric protein that contains a fragment of the sexual-stage *Pfs48/45-6C* protein genetically fused to GMZ2, an asexual-stage vaccine construct consisting of conserved domains of glutamate-rich protein (GLURP) and merozoite surface protein-3 (MSP-3) [9]. GLURP is expressed in all parasite life cycle stages in the vertebrate host and may contribute to merozoite invasion and formation of the parasitophorous vacuole [10,11], MSP-3 is expressed in the erythrocytic stage and is involved in the invasion of red blood cells, as well as in parasite protection against heme released from unprocessed hemoglobin released after schizont egress [12,13], and *Pfs48/45* is expressed on the surface of gametocytes and gametes, playing a central role in fertilization [14]. Both GLURP and MSP-3 are targets of cytophilic IgG subclasses (IgG1 and IgG3) able to control *P. falciparum* growth in vitro by opsonic phagocytosis [15] and antibody-dependent cellular inhibition (ADCI) [16–18] correlated to protection against high parasitemia and clinical disease in individuals living in endemic areas, while naturally acquired antibodies against *Pfs48/45* can recognize extra-erythrocytic gametes, reducing transmission by preventing fertilization and sporogonic development in the mosquito midgut [19].

Previous studies showed that GMZ2.6c protein was widely recognized by naturally acquired antibodies from individuals of Brazilian endemic areas and that its components (MSP-3, GLURP, and *Pfs48/45*) are immunogenic in natural infection by *P. falciparum*. Moreover, anti-GMZ2.6c antibodies seem to increase with exposure to malaria infection and may contribute to parasite immunity [20]. Considering that antibodies recognize several antigenic determinants of the protein, identifying the contribution of different immunodominant B-cell epitopes of antimalarial vaccine candidates that induce specific immune responses may be an important tool for understanding protective immunity. Therefore, the present work aimed to identify and validate immunodominant B-cell epitopes of the *P. falciparum* chimeric protein GMZ2.6c in individuals exposed to malaria living in the Brazilian Amazon.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Area and Volunteers

A cross-sectional cohort study was carried out from June to August 2016 and 2018 in three malaria-endemic areas of the Brazilian Amazon: Cruzeiro do Sul (07°37'50" S/72°40'13" W) and Mâncio Lima (07°36'49" S/72°53'47" W), both high-risk areas situated in Juruá Valley, Acre State, the main *P. falciparum* malaria hotspot in Brazil, and Guajará (02°58'18" S/57°40'38" W), a medium-risk area situated in Amazonas State. Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, and Guajará registered 5,447, 1,432, and 674 cases in 2016, accounting for 52.6% of all *P. falciparum* infections in Brazil. Due to the increase in *P. falciparum* cases in other municipalities, this number decreased to 24.1% in 2018, with 2,915, 1,719, and 452 *P. falciparum* infections in Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, and Guajará, respectively [21].



Serum samples from 303 malaria-exposed individuals identified as responders to GLURP<sub>27–500</sub> ( $n = 258$ ), MSP-3<sub>155–249</sub> ( $n = 170$ ), and/or Pfs48/45<sub>291–428</sub> ( $n = 108$ ) recombinants (Table S1), as previously described [20], were used to investigate specific naturally acquired antibody response to GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 epitopes. In addition, serum samples from 5 individuals of the laboratory staff (Rio de Janeiro, Brazil) who had neither history of malaria nor contact with malaria transmission areas were included in our study (Rio de Janeiro controls).

## 2.2. Epidemiological Survey

Donors providing informed consent answered an epidemiological survey. To evaluate the degree of malaria exposure, subjects responded to questions related to personal data such as age, time of residence in the endemic area, number of previous malaria episodes, time elapsed from the last infection, use of malaria prophylaxis, and presence of symptoms.

## 2.3. Blood Sampling and Malaria Diagnosis

Venous peripheral blood (20 mL) was collected into Heparin or EDTA tubes for antibodies analysis or molecular diagnosis, respectively. The plasma was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and the pellets, containing peripheral blood cells collected into EDTA tubes, were mixed with equal volumes of a cryopreservation solution (0.9% NaCl/4.2% sorbitol/20% glycerol) and were stored at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use.

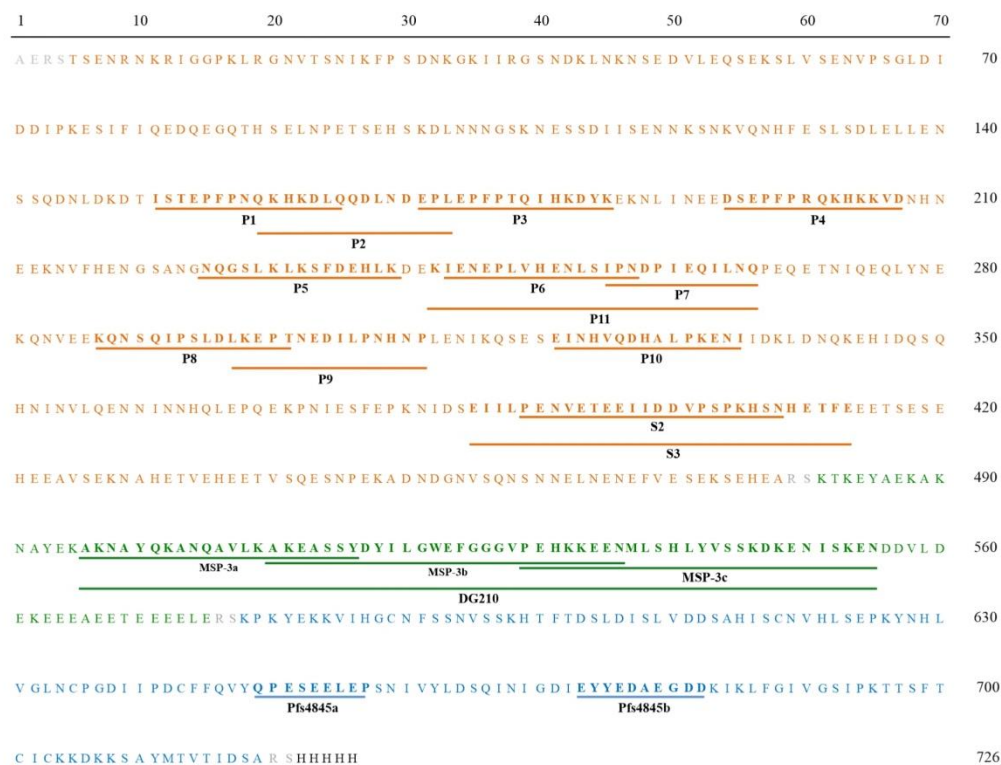
Thin and thick blood smears were examined for identification of malaria parasites by a technician experienced in malaria diagnosis from the Laboratory of Malaria Research (Fiocruz), which is the headquarters of the CEMART (Centre for Malaria Research and Training), a reference center for malaria diagnosis in the Extra-Amazonian Region for the Brazilian Ministry of Health. Thick blood smears from all the subjects were stained with Giemsa, and a total of 200 microscopic fields were examined under a 1000-fold magnification. Thin blood smears of the positive samples were examined for species identification. The parasite density was determined by counting the parasites in a predetermined number of white blood cells in the thick blood films, and the number of blood parasites per milliliter was calculated [22]. To increase the sensitivity of the parasite detection, molecular analysis using specific primers for genus (*Plasmodium* sp.) and species (*P. falciparum* and *P. vivax*) was performed in all samples, as previously described [23]. Positive donors for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated by the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health [24].

## 2.4. B-Cell Epitope Prediction of Pfs48/45

The prediction of linear B-cell epitopes of Pfs48/45<sub>291–428</sub> (UniProt: Q8I6T1) was carried out using the program BepiPred 1.0 [25]. This method is based on the combination of hidden Markov and propensity scale models, which consider hydrophilicity and secondary structure prediction. The server outputs a prediction score for each amino acid for each input FASTA sequence. To identify potential linear B-cell epitopes was used the cut-off value of 0.35, ensuring a sensibility of 49% and specificity of 75% to this approach. Linear B-cell epitopes are predicted to be located at the residues with the highest scores. Sequences with a BepiPred score above 0.35 were considered potential linear B-cell epitopes in regions that could be accessed by naturally acquired antibodies.

## 2.5. Synthetic Peptides

B-cell epitope mapping was performed using four synthetic peptides of MSP-3<sub>155–249</sub> (MSP-3a, MSP-3b, MSP-3c, and DG210) and 13 synthetic peptides of GLURP<sub>27–500</sub> (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, S2, and S3), previously described [26,27]. Moreover, two synthetic peptides of Pfs48/45<sub>291–428</sub> (Pfs48/45a and Pfs48/45b) identified by prediction of linear B-cell epitopes were used (Figure 1). The selected sequences were synthesized by fluorenylmethoxycarbonyl (F-moc) solid-phase chemistry (GenOne Biotechnologies, Brazil). Analytical chromatography of the peptide demonstrated a purity of >95%.



**Figure 1.** Amino acid sequence and linear epitopes of GMZ2.6c hybrid protein. Amino acid sequence of *Pf*GLURP (orange), *Pf*MSP-3 (green), and *Pfs*48/45 (blue). Bold letters represent linear epitopes. Orange, green, and blue lines represent *Pf*GLURP, *Pf*MSP-3, and *Pfs*48/45 epitopes, respectively.

## 2.6. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Microtiter 96-well plates (Maxisorp, NUNC, Roskilde, Denmark) were coated with 5 µg/mL of each synthetic peptide in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, at 100 µL/well overnight at 4 °C. The plates were washed with phosphate-buffered saline 0.05% Tween20 (PBST), and the uncoated sites were blocked with 5% powdered milk containing PBST for 1 h at 37 °C. Serum samples diluted 1:100 in dilution buffer (1% powdered milk containing PBST) were added in duplicate wells, and plates were incubated for 1 h at 37 °C. The plates were washed, 100 µL of peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1:1000 in dilution buffer was added, and the plates were incubated for 1 h at 37 °C. To detect specific IgG subclass, plates were incubated with peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (Clones: 4E3, 31-7-4, HP6050, and HP6025 for IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4, respectively; SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) 1:1000 in dilution buffer for 1 h at 37 °C. After washing, 100 µL of a solution of 0.4 mg/mL orthophenylenediamine (OPD, Sigma) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Sigma) in citrate-phosphate buffer (24 mM citric acid, Sigma, and 51 mM dibasic sodium phosphate, Sigma), pH 5.0, were added to each well, the plates were incubated for 5 min at room temperature in the dark, and then 50 µL/well of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma) were added. Optical density was identified at 492 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Samples of non-endemic controls obtained from 5 individuals of the laboratory staff (Rio de Janeiro controls) were used to establish the normal range for each assay. The cut-off values were determined as the mean optical density (OD) plus 3 standard deviations of the Rio de Janeiro controls. The results were expressed as the reactivity index (RI), which was

calculated by the OD mean of each tested sample divided by the cut-off value. Subjects were scored as responders if the RI against each epitope was higher than 1.0.

### 2.7. Statistical Analysis

Data were stored in the Epi-Info version 6 data bank system (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) and analyzed using Epi-Info version 6 and GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) software programs. Normality tests were performed in all variables using the one-sample Kolmogorov–Smirnov test. The chi-square analysis was applied to compare the prevalence among groups. Kruskal–Wallis, followed by uncorrected Dunn’s test (for multiples comparisons) or Mann–Whitney test (comparisons between two groups), was used to analyze differences in distributions of continuous numerical variables. The Spearman rank coefficient test was used to analyze the correlation between variables. A two-sided *p*-value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Population Characteristics

The studied population was composed of 303 individuals living in three malaria-endemic areas of the Brazilian Amazon (Table 1). The population age ranged from 12 to 88 years old (median: 32 years; interquartile range: 28–34) and presented a similar frequency of female (47.5%) and male (52.5%) individuals. Most participants (99%) were naturally exposed to malaria infection throughout the years (median: 31 years; interquartile range: 28–34), and 295 (97.4%) reported one or more previous malaria episodes. Among those who remembered the *Plasmodium* species, previous episodes were attributed only to *P. falciparum* (12 cases), to *P. vivax* (50 cases), or both parasites (199 cases). The number of reported past malaria episodes varied greatly among participants, ranging from 0 to 100 (median: 8; interquartile range: 6–10). The time elapsed since the last malaria infection ranged from 0 to 684 months (median: 12 months; interquartile range: 6–12). At the time of blood sampling, 145 individuals (47.8%) presented symptoms that started 1 to 30 days earlier (median: 4 days; interquartile range: 2–4), with headache, fever, and chills the most frequent ones. A total of 135 individuals (44.5%) had detectable parasites, 53 (17.5%) were infected with *P. falciparum* (median parasitemia: 8000 parasites/ $\mu$ L of blood; interquartile range: 4000–12,000), and 82 (27%) were infected with *P. vivax* (median parasitemia: 20,000 parasites/ $\mu$ L of blood; interquartile range: 7000–32,000).

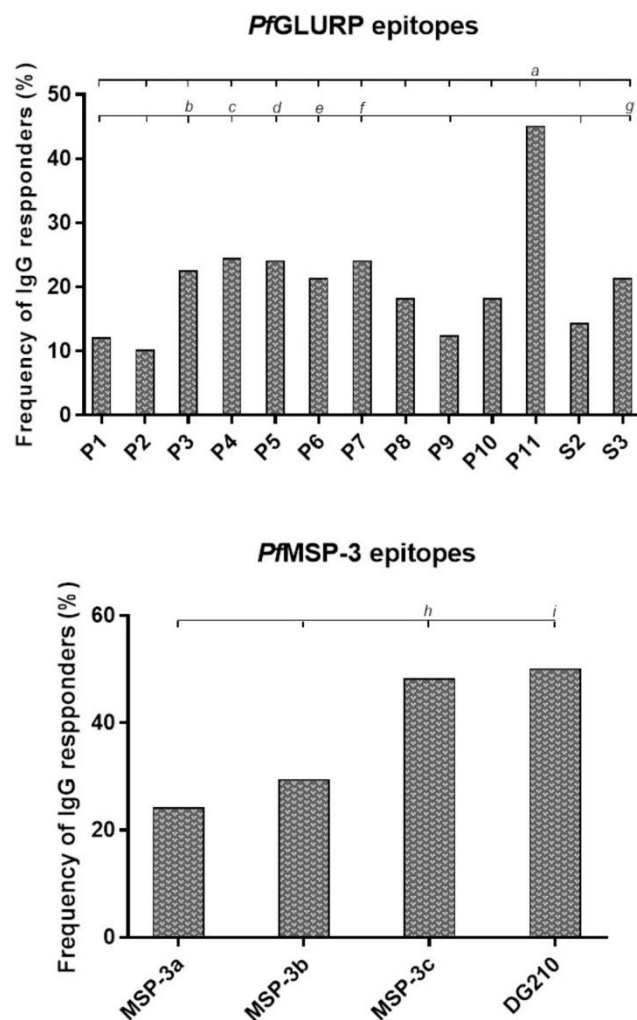
**Table 1.** The studied population’s personal, clinical, and epidemiological characteristics.

Personal Data		<i>n</i> = 303
Sex	Male	159/303 (52.5%)
	Female	144/303 (47.5%)
Age (years)		32 (28–34)
Time of residence in malaria-endemic area (years)		31 (28–34)
Clinical And Epidemiological Data		
Number of past malaria episodes		8 (6–10)
Time elapsed since the last malaria episode (months)		12 (6–12)
Time of symptoms (days)		4 (2–4)
Diagnosis	<i>P. falciparum</i>	53 (17.5%)
	<i>P. vivax</i>	82 (27%)
Parasitemia (parasites/ $\mu$ L of blood)	<i>P. falciparum</i>	8000 (4000–12,000)
	<i>P. vivax</i>	20,000 (7000–32,000)

Age, time of residence in malaria-endemic area (years), number of past malaria episodes, time elapsed since the last malaria episode (months), time of symptoms (days), and parasitemia (parasites/ $\mu$ L of blood) are represented by median (interquartile range). *n*: number; %: percentage.

### 3.2. Frequencies and IgG Levels of Pre-Identified Linear B-Cell Epitopes of GLURP<sub>27-500</sub> and MSP-3<sub>155-249</sub>

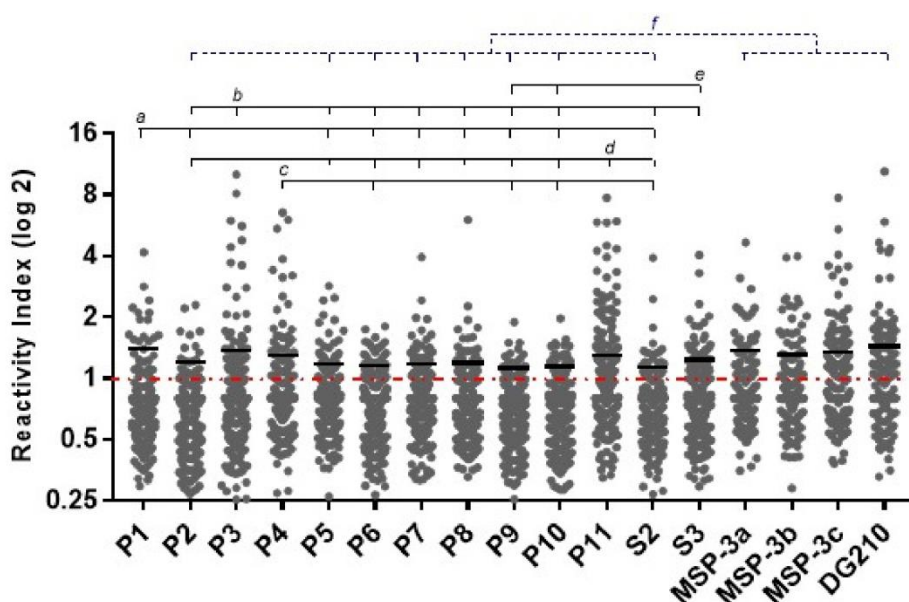
Firstly, amino acid sequences from GLURP<sub>27-500</sub> (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, S2, and S3) and MSP-3<sub>155-249</sub> (MSP-3a, MSP-3b, MSP-3c, and DG210) previously identified as B-cell epitopes to validate their immunodominance in the studied population were selected. The frequencies of individuals with IgG antibodies that recognized at least one of the peptides were 70.9% and 64.7% for GLURP and MSP-3, respectively. The frequency of IgG antibody response varied depending on the peptide, showing that P11 from GLURP<sub>27-500</sub> and MSP-3c and DG210 from MSP-3<sub>155-249</sub> were preferentially recognized by antibodies from exposed individuals (Figure 2). Although lower, the frequencies of individuals with IgG antibodies against epitopes P3, P4, P5, P6, P7, and S3 were higher than the frequencies of individuals with IgG antibodies against epitopes P1, P2, P9, and S2 (Figure 2).



**Figure 2.** Frequency of individuals presenting IgG antibodies against epitopes derived from GLURP<sub>27-500</sub>, MSP-3<sub>155-249</sub>. Frequency of IgG responders to *Pf*GLURP and *Pf*MSP-3 epitopes. a:  $p < 0.0001$  P11 versus all *Pf*GLURP epitopes; b:  $p < 0.05$  P3 versus S2,  $p < 0.005$  P3 versus P1 and P9,

$p < 0.0005$  P3 versus P2;  $c$ :  $p < 0.005$  P4 versus S2,  $p < 0.0005$  P4 versus P1, P2, and P9;  $d$ :  $p < 0.05$  P5 versus S2,  $p < 0.0005$  P5 versus P1, P2, and P9;  $e$ :  $p < 0.05$  P6 versus P9 and S2,  $p < 0.005$  P6 versus P1,  $p < 0.0005$  P6 versus P2;  $f$ :  $p < 0.05$  P7 versus S2,  $p < 0.0005$  P7 versus P1, P2, and P9;  $g$ :  $p < 0.05$  S3 versus P9 and S2,  $p < 0.005$  S3 versus P1,  $p < 0.0005$  S3 versus P2;  $h$ :  $p < 0.0001$  MSP-3c versus MSP-3a,  $p = 0.0004$  MSP-3c versus MSP-3b;  $i$ :  $p < 0.0001$  DG210 versus MSP-3a,  $p = 0.0001$  DG210 versus MSP-3b.

Regarding the magnitude of response to epitopes among responders, higher levels of IgG antibodies against epitopes P1, P3, P4, P11, and S3 were observed. No difference was observed in IgG antibody levels between MSP-3<sub>155-249</sub> epitopes. However, MSP-3 epitopes MSP-3a, MSP-3c, and DG210 induced higher IgG antibody levels than GLURP epitopes P2, P5, P6, P7, P8, P9, P10, and S2 (Figure 3).



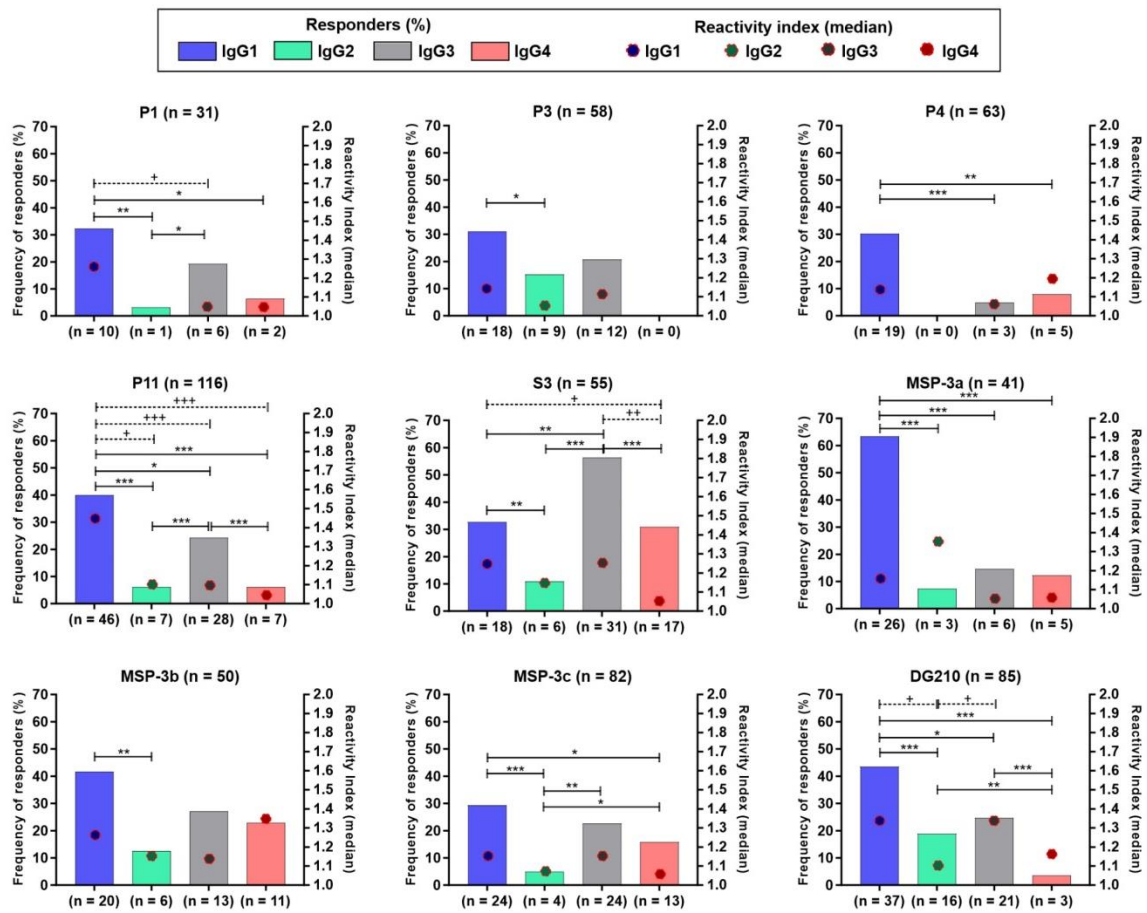
**Figure 3.** Levels of IgG antibodies (reactivity index) against GLURP<sub>27-500</sub> and MSP-3<sub>155-249</sub> epitopes. Reactivity indices are individual values. The dashed red line represents the positivity limit. Lines represent the median. *a*:  $p < 0.05$  P1 versus P2, P5, P7, and P8;  $p < 0.005$  P1 versus P6, P9, P10, and S2; *b*:  $p < 0.05$  P3 versus P2 and S3;  $p < 0.005$  P3 versus P5, P7, and P8;  $p < 0.0005$  P3 versus P6, P9, P10, and S2; *c*:  $p < 0.05$  P4 versus P6, P9, and S2;  $p < 0.005$  P4 versus P10; *d*:  $p < 0.05$  P11 versus P2, P5, P7, and P8;  $p < 0.005$  P11 versus S2;  $p < 0.0005$  P11 versus P6, P9, and P10; *e*:  $p < 0.05$  S3 versus P9 and P10; *f*:  $p < 0.05$  MSP-3a versus P2, P5, P7, and P8; MSP-3b versus P5 and S2; MSP-3c and DG210 versus P2;  $p < 0.005$  MSP-3b versus P6, P9, and P10; MSP-3c and DG210 versus P5, P7, and P8;  $p < 0.0005$  MSP-3a versus P6, P9, and P10; MSP-3c and DG210 versus P6, P9, P10, and S2.

No association was observed among frequency of responders or IgG antibody levels and age, sex, time of exposure, presence of symptoms, number of reported previous malaria episodes, the time elapsed since the last malaria episode, and current or last infecting plasmodial species.

### 3.3. IgG Subclasses Distribution against the Immunodominant Epitopes of GLURP<sub>27-500</sub> and MSP-3<sub>155-249</sub>

To evaluate the balance between cytophilic and non-cytophilic antibodies, immunodominant epitopes derived from GLURP<sub>27-500</sub> (P1, P3, P4, P11, and S3) and MSP-3<sub>155-249</sub> (MSP-3a, MSP-3b, MSP-3c, and DG210) were selected. The results showed that epitopes P1,

P3, P11, and S3 of GLURP and MSP-3b, MSP-3c, and DG210 of MSP-3 were preferentially recognized by IgG1 and IgG3 cytophilic antibodies, while epitopes P4 of GLURP and MSP-3a of MSP-3 were preferentially recognized by antibodies of the IgG1 subclass. No difference was observed between IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 antibody levels in responders to P3, P4, MSP-3a, MSP-3b, and MSP-3c. However, higher IgG1 than IgG3 antibody levels against P1 and IgG1 than IgG2, IgG3, and IgG4 antibody levels against P11 were detected. In addition, IgG1 and IgG3 were higher than IgG4 antibody levels against S3 and IgG2 antibody levels against DG210 (Figure 4).

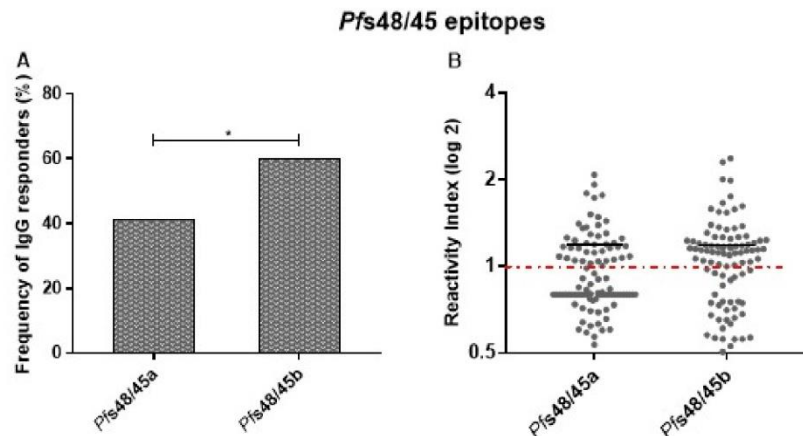


**Figure 4.** Frequency and levels of IgG subclasses against the immunodominant epitopes from GLURP<sub>27-500</sub> and MSP-3<sub>155-249</sub>. The bars represent the frequency of responders, and the circles with broken red lines represent IgG subclasses levels (median). Significant differences among subclass frequencies were indicated by \* and significant differences among subclasses levels were indicated by +; (\*; +)  $p < 0.05$ ; (\*\*; ++)  $p < 0.005$ ; (\*\*\*, +++)  $p < 0.0005$ .

IgG1 antibody levels against P1 and P11 were positively correlated with age and time of residence in malaria-endemic area (P1:  $p = 0.002$ ;  $r = 0.530$ ; for both; P11:  $p = 0.02$ ;  $r = 0.207$ ;  $p = 0.03$ ;  $r = 0.201$ ; respectively). In addition, IgG3 antibody levels against DG210 were associated with the number of previous malaria episodes ( $p = 0.034$ ;  $r = 0.240$ ), while IgG1 antibody levels against P3 were negatively correlated with time elapsed since the last malaria episode ( $p = 0.024$ ;  $r = -0.316$ ).

### 3.4. Experimental Validation of Predicted Linear B-Cell Epitopes of *Pfs48/45*<sub>291–428</sub>

Two sequences were predicted as potential linear B-cell epitopes on *Pfs48/45*<sub>291–428</sub> (*Pfs48/45a* and *Pfs48/45b*) and selected for experimental validation. Most responders to *Pfs48/45*<sub>291–428</sub> recombinant protein presented detectable IgG antibodies against epitopes *Pfs48/45a* and/or *Pfs48/45b*. A higher frequency of individuals presenting IgG antibodies against *Pfs48/45b* than *Pfs48/45a* was observed. However, low IgG antibody levels were detected in epitopes, without differences between *Pfs48/45a* and *Pfs48/45b* (Figure 5).



**Figure 5.** Frequency and levels of IgG antibodies against predicted *Pfs48/45*<sub>291–428</sub> epitopes. (A) Frequencies of IgG responders to *Pfs48/45*<sub>291–428</sub> epitopes. \*  $p = 0.0097$ . (B) Levels of IgG antibodies to *Pfs48/45*<sub>291–428</sub> epitopes. Reactivity indices are individual values. The dashed red line represents the positivity limit. Lines represent the median.

The analyses of IgG subclasses were performed in all samples with detectable IgG antibodies against *Pfs48/45a* or *Pfs48/45b*. The frequencies of IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 against *Pfs48/45a* were 21%, 0%, 37% and 9%, respectively, and against *Pfs48/45b* were 43%, 11%, 26%, and 21%, respectively. The data showed a higher frequency of individuals presenting IgG3 than IgG4 antibodies against *Pfs48/45a* ( $p = 0.002$ ) and IgG1 than IgG2, IgG3, and IgG4 antibodies against *Pfs48/45b* ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.03$  and  $p = 0.007$  versus IgG2, IgG3, and IgG4, respectively). No difference was observed in IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 antibody levels against *Pfs48/45* epitopes.

### 3.5. Frequencies and IgG Antibody Levels in Non-Infected and Infected by *P. vivax* and *P. falciparum* Individuals

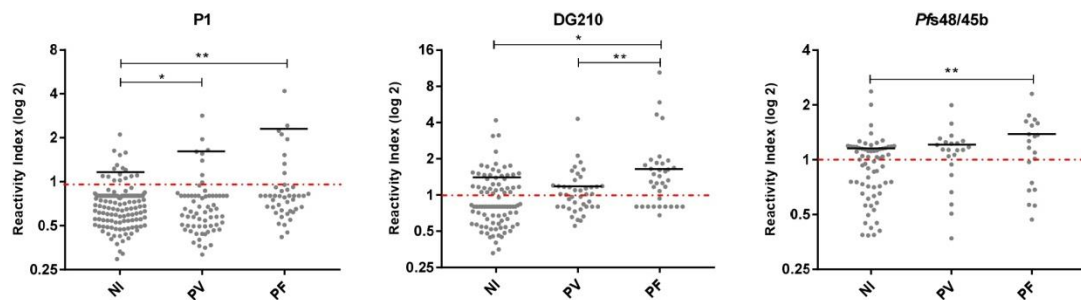
Frequencies and IgG antibody levels to GLURP<sub>27–500</sub>, MSP-3<sub>155–249</sub>, and *Pfs48/45*<sub>291–428</sub> epitopes were compared between non-infected and infected by *P. vivax* and *P. falciparum* individuals. The results showed higher frequencies of individuals responders to P7 and P8 infected by *P. falciparum* when compared with *P. vivax*-infected individuals. Responders to S3 epitope infected by *P. vivax* were less frequent than non-infected and *P. falciparum*-infected individuals. Individuals infected by *P. falciparum* presented a higher frequency of response to MSP-3a, MSP-3b, and MSP-3c epitopes than non-infected and *P. vivax*-infected individuals, while the frequency of responders to DG210 infected by *P. falciparum* was higher than non-infected individuals (Table 2). No difference was observed in frequencies of responders to P1, P2, P3, P4, P5, P6, P9, P10, P11, S2, *Pfs48/45a*, and *Pfs48/45b* between individuals non-infected and infected by *P. vivax* or *P. falciparum*.

**Table 2.** IgG antibody response in non-infected and *P. vivax*- or *P. falciparum*-infected individuals.

		NI	PV	PF
P7	Responders	37/148 (25%)	10/65 (15.4%)	15/45 (33.3%) <sup>a</sup>
	Non-responders	111/148 (75%)	55/65 (84.6%)	30/45 (66.7%)
P8	Responders	30/152 (19.7%)	6/63 (9.5%)	11/43 (25.6%) <sup>b</sup>
	Non-responders	122/152 (80.3%)	57/63 (90.5%)	32/43 (74.4%)
S3	Responders	41/161 (25.5%)	3/61 (4.9%) <sup>c</sup>	11/36 (30.6%)
	Non-responders	120/161 (74.5%)	58/61 (95.1%)	25/36 (69.4%)
MSP-3a	Responders	15/91 (16.5%)	6/43 (14%)	20/36 (55.6%) <sup>d</sup>
	Non-responders	76/91 (83.5%)	37/43 (86%)	16/36 (44.4%)
MSP-3b	Responders	20/90 (22.2%)	11/44 (25%)	19/36 (52.8%) <sup>e</sup>
	Non-responders	70/90 (77.8%)	33/44 (75%)	17/36 (47.2%)
MSP-3c	Responders	42/94 (44.7%)	16/42 (38.1%)	24/34 (70.6%) <sup>f</sup>
	Non-responders	52/94 (55.3%)	26/42 (61.9%)	10/34 (29.4%)
DG210	Responders	38/93 (40.9%)	23/42 (54.8%)	24/35 (68.6%) <sup>g</sup>
	Non-responders	55/93 (59.1%)	19/42 (45.2%)	11/35 (31.4%)

NI: non-infected individuals; PV: *P. vivax*-infected individuals; PF: *P. falciparum*-infected individuals. <sup>a</sup>  $p = 0.02$  PF versus PV; <sup>b</sup>  $p = 0.02$  PF versus PV; <sup>c</sup>  $p = 0.0006$  NI versus PV; <sup>d</sup>  $p < 0.0001$  NI versus PF; <sup>e</sup>  $p = 0.01$  PV versus PF; <sup>f</sup>  $p = 0.0008$  NI versus PF; <sup>g</sup>  $p = 0.01$  PV versus PF; <sup>f</sup>  $p = 0.009$  NI versus PF; <sup>g</sup>  $p = 0.004$  PV versus PF; <sup>h</sup>  $p = 0.005$  NI versus PF.

IgG antibody levels against P1 were higher in *P. vivax* and *P. falciparum*-infected than in non-infected individuals. In addition, *P. falciparum*-infected individuals presented higher IgG antibody levels than *P. vivax*-infected and non-infected individuals against DG210 than non-infected individuals against Pfs48/45b (Figure 6). No difference was observed in antibody levels against P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, S2, S3, MSP-3a, MSP-3b, MSP-3c, and Pfs48/45a epitopes between non-infected and infected by *P. vivax* or *P. falciparum* individuals.



**Figure 6.** Levels of IgG antibodies (reactivity index) against P1, DG210, and Pfs48/45b epitopes in non-infected and infected by *P. vivax* and *P. falciparum* individuals. Reactivity indices are individual values. The dashed red line represents the positivity limit. Lines represent the median. NI: non-infected individuals; PV: *P. vivax*-infected individuals; PF: *P. falciparum*-infected individuals. P1: \*  $p = 0.02$  NI versus PV, \*\*  $p = 0.002$  NI versus PF; DG210: \*  $p = 0.01$  NI versus PF, \*\*  $p = 0.001$  PV versus PF; Pfs48/45b: \*\*  $p = 0.002$  NI versus PF.

#### 4. Discussion

The GMZ2.6c malaria vaccine candidate is a multi-stage *P. falciparum* chimeric protein that contains the sexual-stage Pfs48/45<sub>291–428</sub> fragment genetically fused to GMZ2, an asexual-stage vaccine construction consisting of GLURP<sub>27–500</sub> and MSP-3<sub>155–249</sub> antigens [9]. The GMZ2.6c and its components were widely recognized by naturally acquired antibodies from Brazilian exposed individuals [20]. Antibodies recognize and bind their target protein antigens by surface-accessible sites, known as antigenic determinants or epitopes [28]. The identification of B-cell epitopes of proteins is an important tool for the development of



epitope-based vaccines [29], diagnostic tests [30], immunotherapy [31], and understanding specific immune responses against pathogens. This work identified and validated the immunodominant B-cell epitopes of GLURP<sub>27–500</sub>, MSP-3<sub>155–249</sub>, and Pfs48/45<sub>291–428</sub> antigens, components of GMZ2.6c malaria vaccine candidate in individuals exposed to malaria in the Brazilian Amazon.

The studied population was composed of individuals living in three malaria-endemic areas of the Brazilian Amazon, Cruzeiro do Sul and Mâncio Lima, Acre State, and Guajará, Amazonas State. The highly variable range of age, time of residence in the endemic area, reported number of previous malaria episodes, and the time elapsed from the last infection indicated different degrees of exposure among the studied individuals, an important determinant of protection against clinical malaria [32,33]. Most of the individuals reported previous infections by both *P. falciparum* and *P. vivax*, but *P. vivax* was the most prevalent infecting plasmodial species, reflecting the current malaria scenario in Brazil, where 89% of the recorded cases are due to *P. vivax* infection [34].

GLURP and MSP-3 were identified as targets of naturally acquired antibodies capable of mediating parasite killing in cooperation with monocytes [35,36] associated with malaria protection in several epidemiological statuses [37–42]. Considering the protective role of antibodies against GLURP and MSP-3, the antigenicity of these proteins has been evaluated in epitope mapping studies. In the present work, 13 peptides derived from GLURP<sub>27–500</sub> previously predicted as potential B-cell epitopes [27], four peptides derived from MSP-3<sub>155–249</sub>, a polypeptide recognized by antibodies from clinical immune individuals utilizing clones from a DNA library, and its three overlapping peptides [26,35] were used.

Epitope P11 was identified as the immunodominant of the GLURP with both higher frequency of responders and IgG antibody levels in the studied population. Likewise, P11 was identified as the immunodominant B-cell epitope of the GLURP in individuals living in Rondônia State, also in the Brazilian Amazon [43], and *Saimiri sciureus* monkeys immunized with a hybrid protein containing the R0 region of GLURP and the C-terminal region of MSP-3 [44]. In contrast, only 29% of clinical immune Liberian adults present antibodies against P11, while the immunodominant epitopes were P1, P3, P4, and S3 [27]. The differences in the immunodominance of GLURP B-cell epitopes may be due to polymorphisms in the R0 region of GLURP when isolates from different geographic areas were compared [45], genetic restriction of the antibody response against GLURP-R0 epitopes [43] or differences transmission intensities [46] between endemic areas.

Although with low frequency, the responding individuals displayed high levels of IgG antibodies against the P1, P3, P4, and S3 GLURP epitopes. Interestingly, P1, P3, and P4 contain a common motif (EPPFXQXHK) that appears to be targeted by cross-reactive antibodies [27]. Similarly, affinity-purified antibodies to S3 can recognize the S4 peptide derived from the C-terminal R2 region of GLURP [27]. This finding may suggest that the high antibody levels against these peptides could be the result of cross-reactivity.

The linear peptide containing the amino acid sequence of DG210 from MSP-3 was also shown to be widely recognized by high levels of naturally acquired IgG antibodies. Interestingly, similar frequency and antibody levels to peptide MSP-3c were found, suggesting that antibody response against DG210 may primarily target this epitope in the studied population. Many seroepidemiological studies demonstrated distinct profiles of antibody response to peptides derived from MSP-3CT. Peptide MSP-3b is the major B-cell epitope in hyperimmune individuals [26,35], while subjects with diverse degrees of exposure showed no differences between prevalence and antibody levels against MSP-3b, MSP-3c, and MSP-3d [47]. Antibodies induced after immunization with MSP-3CT LPS were directed against peptides MSP-3c and MSP-3d [48,49], but similar antibody levels against all peptides were found.

It is widely accepted that cytophilic IgG1 and IgG3 isotypes are the main mediators of the protective humoral response against *P. falciparum* blood-stage antigens, promoting Fc-mediated effector functions as antibody-dependent cellular inhibition (ADCI) [50,51], opsonic phagocytosis [52,53], antibody-dependent respiratory burst (ADRB) [54] and

complement activation [55,56]. In contrast, non-cytophilic IgG subclasses (IgG2 and IgG4) with the same specificity could block these effector mechanisms [57]. In our cohort, all the immunodominant epitopes of GLURP and MSP-3 are primarily targeted by IgG1 and/or IgG3 antibodies—predominantly IgG3 isotype against epitope S3 and IgG1 isotype against other epitopes. The prevalence of cytophilic antibodies against MSP-3 and GLURP epitopes was also observed in exposed individuals from Africa [47,58] and immunized European volunteers [48] associated with protection. It is known that genetic background, degrees of exposure of the population, and malaria transmission levels may influence the distribution of IgG subclasses against plasmodial antigens [59]. However, these data suggest that intrinsic characteristics of these antigens might be the major factor that determines antibody cytophilic IgG subclasses response, driving to B-cell activation by the binding of CD40 to CD40L expressed on the surface of activated T cells providing the costimulatory signal and cytokines release, influencing the IgG class switching [60,61].

Correlation analysis of the immune response and epidemiological data showed that IgG1 antibody levels against GLURP epitopes P1 and P11 were positively correlated with age and time of residence in malaria-endemic area, while IgG3 antibody levels against MSP-3 epitope DG210 were associated with the number of previous malaria episodes. In addition, IgG1 antibody levels against GLURP epitope P3 were negatively correlated with time elapsed since the last malaria episode. These may reflect the cumulative exposure of these individuals to *P. falciparum* infections and possibly maturation of the immune system over time [17] but did not provide evidence of a possible protective role of these antibodies since no relationship was verified between the prevalence or levels of specific antibodies and the presence or absence of parasites in the blood, the presence or absence of symptoms at the time of collection, and parasitemia. A detailed evaluation of the functional activity of specific antibodies against these peptides is currently being conducted in our laboratory and may generate further evidence of their possible protective role.

The *Pfs48/45* antigen is one of the most well-characterized antibody targets of *P. falciparum* gametocytes. Several studies showed that antibodies against *Pfs48/45* displayed a transmission reduction activity in the standard membrane-feeding assay (SMFA) [62,63], and antibodies against the conformational epitope I in the 6c domain of *Pfs48/45* have strong transmission block potential in genetically diverse parasite strains and multiclonal infections [64,65]. Transmission-blocking antibodies are known to often target conformational-dependent epitopes [66], and no linear B-cell epitopes against *Pfs48/45* have been described. Here, we identified two potential linear B-cell epitopes (*Pfs48/45a*: *Pfs48/45*<sub>358–366</sub> and *Pfs48/45b*: *Pfs48/45*<sub>382–391</sub>) of *Pfs48/45*-6c domain using *in silico* BepiPred algorithm [25]. Most of the responders to *Pfs48/45*<sub>291–428</sub> recombinant protein (68.5%) presented detectable IgG antibodies against *Pfs48/45a* and/or *Pfs48/45b* peptides, validating the prediction of linear B-cell epitopes. These frequencies are comparable to those found for GLURP<sub>27–500</sub> (70.9%) and MSP-3<sub>155–249</sub> (64.7%) peptides in this study, as well as other *P. falciparum* antigens [67–69]. A higher frequency of responders to *Pfs48/45b* was observed, despite no difference between the antibody levels against both epitopes. Interestingly, antibody levels against *Pfs48/45a* and *Pfs48/45b* were similar to those against *Pfs48/45*<sub>291–428</sub> recombinant protein [20]. These findings indicate that although the minority of B-cell epitopes are linear (~10%) [70], they might be an interesting antibody target. However, the most potent transmission-blocking epitope in *Pfs48/45*-6c is conformational, and the production of a non-properly folded protein did not elicit functional antibodies in mice [71]. Further, the immunization with full-length *Pfs48/45* has revealed that a larger number of antibodies with no transmission-blocking potential recognize the 6c domain of *Pfs48/45* [72]. Additional studies are needed to better understand the humoral immune response against these epitopes and their possible transmission-blocking activity.

Studies have revealed that the high transmission-blocking efficacy of the monoclonal antibody 85RF45.1 is due to its ability to block the normal function of *Pfs48/45* or its binding partners [72], and several IgG subclasses may contribute to the transmission-blocking activity. Curiously, the high frequency of IgG1 and IgG3 against *Pfs48/45b*

and Pfs48/45a, respectively, and the less proportion of IgG2 and IgG4 antibodies to both epitopes suggest a possible role of the classical complement activation pathway. Although there is no evidence of the relevance of the anti-Pfs48/45 antibody–complement system interaction in transmission-blocking immunity, antibodies against the sexual-stage antigen Pfs230 showed an increase in transmission-blocking activity in the presence of human complement system proteins [73].

Specific antibodies against sexual-stage antigens are also related to age and serve as markers of exposure, increasing according to gametocyte densities [62,74,75], but no correlation with epidemiological parameters was found in this study. This finding is not surprising since, in malaria-endemic areas, infections are determined by microscopic parasite counts, and gametocytes normally occur at low densities. In addition, no other higher-sensitive method to detect gametocytes was used.

In conclusion, the data presented here showed that P11 from GLURP, MSP-3c, and DG210 from MSP-3, and the predicted epitopes Pfs48/45a and Pfs48/45b from Pfs48/45<sub>291</sub> were widely recognized by antibodies from individuals living in endemic areas of Brazil. Combined immunoinformatic and experimental approach strategies identified several linear B-cell epitopes from GLURP<sub>27–500</sub>, MSP-3<sub>155–249</sub>, and Pfs48/45<sub>291–428</sub> fragments that composed GMZ2.6c, providing additional information that may suggest its relevance as a multi-stage malaria vaccine candidate. Further studies are needed to assess the potential of specific antibodies against GMZ2.6c epitopes in the inhibition of *P. falciparum* growth and transmission-blocking activity.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines11020446/s1>, Table S1: IgG reactivity index for GLURP, MSP-3, and Pfs48/45 recombinant proteins.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.R.P.-R., C.T.D.-R., M.T., S.K.S. and L.E.A.; Data curation, L.R.P.-R. and B.d.O.B.; Formal analysis, B.d.O.B.; Funding acquisition, L.R.P.-R. and C.T.D.-R.; Investigation, B.d.O.B., A.B.L.d.S., L.T.d.Q., L.S.d.O. and R.N.R.-d.-S.; Methodology, L.R.P.-R. and B.d.O.B.; Project administration, L.R.P.-R.; Resources, L.R.P.-R., B.d.O.B., A.B.L.d.S., E.K.P.R., P.R.R.T., R.M.d.S., J.d.C.L.-J., H.A.d.S.d.S. and J.P.d.B.; Supervision, L.R.P.-R.; Writing—Original draft, B.d.O.B.; Writing—Review and editing, L.R.P.-R., E.K.P.R., P.R.R.T., J.d.C.L.-J. and C.T.D.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/INOVA) project VPPCB-007-FIO-18-2-46, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) project 425.422/2016-0, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (Pronex), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) project E-26/010.001268/2016. This study was also supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)—Finance Code 0001. C.T.D.-R. is the recipient of a Productivity Research Fellowship from CNPq, Brazil, and is a “Cientista do Nosso Estado”, recognized by the FAPERJ, Rio de Janeiro, Brazil. The Laboratório de Pesquisa em Malária is an Associate Laboratory of the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação (INCT-NIM/CNPq) project 465489/2014-1 and of the Rede de Neuroinflamação (Redes/FAPERJ) project 26010.002418/2019.

**Institutional Review Board Statement:** The study protocol was reviewed and approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248).

**Informed Consent Statement:** Written informed consent has been obtained from all adult donors or donors’ parents in the cases of children. All the procedures adopted in this study fully complied with specific federal permits issued by the Brazilian Ministry of Health.

**Data Availability Statement:** The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We are grateful to all individuals who agreed to participate in this study for their cooperation and generous donation of blood samples, which made this study possible, and to the Endemic Diseases Coordination of the cities of Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, and Guajará for the support during the fieldwork. We are also thankful to Heloisa Maria Nogueira Diniz for helping with figures and to Marcelo Urbano Ferreira for providing facilities in the malaria-endemic areas.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- World Health Organization World Malaria Report. Available online: <https://www.malariaworld.org/blogs/world-malaria-report-2022> (accessed on 26 December 2022).
- Dimbu, P.R.; Horth, R.; Cândido, A.L.M.; Ferreira, C.M.; Caquece, F.; Garcia, L.E.A.; André, K.; Pembele, G.; Jandondo, D.; Bondo, B.J.; et al. Continued Low Efficacy of Artemether-Lumefantrine in Angola in 2019. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e01949-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mathieu, L.C.; Cox, H.; Early, A.M.; Mok, S.; Lazrek, Y.; Paquet, J.C.; Ade, M.P.; Lucchi, N.W.; Grant, Q.; Udhayakumar, V.; et al. Local Emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* K13 C580Y Mutants Associated with in Vitro Artemisinin Resistance. *Elife* **2020**, *9*, e51015. [[CrossRef](#)]
- Gansané, A.; Moriarty, L.F.; Ménard, D.; Yerbanga, I.; Ouedraogo, E.; Sondo, P.; Kinda, R.; Tarama, C.; Soulama, E.; Tapsoba, M.; et al. Anti-Malarial Efficacy and Resistance Monitoring of Artemether-Lumefantrine and Dihydroartemisinin-Piperaquine Shows Inadequate Efficacy in Children in Burkina Faso, 2017–2018. *Malar. J.* **2021**, *20*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Uwimana, A.; Umulisa, N.; Venkatesan, M.; Svigel, S.S.; Zhou, Z.; Munyaneza, T.; Habimana, R.M.; Rucogoza, A.; Moriarty, L.F.; Sandford, R.; et al. Association of *Plasmodium falciparum* Kelch13 R561H Genotypes with Delayed Parasite Clearance in Rwanda: An Open-Label, Single-Arm, Multicentre, Therapeutic Efficacy Study. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, 1120–1128. [[CrossRef](#)]
- Das, S.; Kar, A.; Manna, S.; Mandal, S.; Mandal, S.; Das, S.; Saha, B.; Hati, A.K. Artemisinin Combination Therapy Fails Even in the Absence of *Plasmodium falciparum* Kelch13 Gene Polymorphism in Central India. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9946. [[CrossRef](#)]
- Hancock, P.A.; Hendriks, C.J.M.; Tangena, J.A.; Gibson, H.; Hemingway, J.; Coleman, M.; Gething, P.W.; Cameron, E.; Bhatt, S.; Moyes, C.L. Mapping Trends in Insecticide Resistance Phenotypes in African Malaria Vectors. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000633. [[CrossRef](#)]
- Mugo, R.M.; Mwai, K.; Mwacharo, J.; Shee, F.M.; Musyoki, J.N.; Wambua, J.; Otieno, E.; Bejon, P.; Ndungu, F.M. Seven-Year Kinetics of RTS,S/AS01-Induced Anti-CSP Antibodies in Young Kenyan Children. *Malar. J.* **2021**, *20*, 452. [[CrossRef](#)]
- Baldwin, S.L.; Roeffen, W.; Singh, S.K.; Tiendrebeogo, R.W.; Christiansen, M.; Beebe, E.; Carter, D.; Fox, C.B.; Howard, R.F.; Reed, S.G.; 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**, *34*, 2207–2215. [[CrossRef](#)]
- Borre, M.B.; Dziegiel, M.; Høgh, B.; Petersen, E.; Rieneck, K.; Riley, E.; Meis, J.F.; Aikawa, M.; Nakamura, K.; Harada, M.; et al. Primary Structure and Localization of a Conserved Immunogenic *Plasmodium falciparum* Glutamate Rich Protein (GLURP) Expressed in Both the Preerythrocytic and Erythrocytic Stages of the Vertebrate Life Cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**, *49*, 119–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- del Quintana, M.P.; Ch'ng, J.H.; Zandian, A.; Imam, M.; Hultenby, K.; Theisen, M.; Nilsson, P.; Qundos, U.; Moll, K.; Chan, S.; et al. SURGE Complex of *Plasmodium falciparum* in the Rhoptry-Neck (SURFIN4.2-RON4-GLURP) Contributes to Merozoite Invasion. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- McCull, D.J.; Anders, R.F. Conservation of Structural Motifs and Antigenic Diversity in the *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-3 (MSP-3). *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *90*, 21–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Imam, M.; Singh, S.; Kaushik, N.K.; Chauhan, V.S. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 3. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 3856–3868. [[CrossRef](#)]
- van Dijk, M.R.; Janse, C.J.; Thompson, J.; Waters, A.P.; Braks, J.A.M.; Dodemont, H.J.; Stunnenberg, H.G.; van Gemert, G.J.; Sauerwein, R.W.; Eling, W. A Central Role for P48/45 in Malaria Parasite Male Gamete Fertility. *Cell* **2001**, *104*, 153–164. [[CrossRef](#)]
- Kana, I.H.; Adu, B.; Tiendrebeogo, R.W.; Singh, S.K.; Dodoo, D.; Theisen, M. Naturally Acquired Antibodies Target the Glutamate-Rich Protein on Intact Merozoites and Predict Protection Against Febrile Malaria. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 623–630. [[CrossRef](#)]
- Dodoo, D.; Theisen, M.; Kurtzhals, J.A.L.; Akanmori, B.D.; Koram, K.A.; Jepsen, S.; Nkrumah, F.K.; Theander, T.G.; Hviid, L. Naturally Acquired Antibodies to the Glutamate-Rich Protein Are Associated with Protection against *Plasmodium falciparum* Malaria. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 1202–1205. [[CrossRef](#)]
- Soe, S.; Theisen, M.; Roussillon, C.; Aye, K.S.; 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*, 247–252. [[CrossRef](#)]
- Lusingu, J.P.A.; Vestergaard, L.S.; Alifrangis, M.; Mmbando, B.P.; Theisen, M.; Kitua, A.Y.; Lemnge, M.M.; Theander, T.G. Cytophilic Antibodies to *Plasmodium falciparum* Glutamate Rich Protein Are Associated with Malaria Protection in an Area of Holoendemic Transmission. *Malar. J.* **2005**, *4*, 48. [[CrossRef](#)]
- Bousema, J.T.; Drakeley, C.J.; Kihonda, J.; Hendriks, J.C.M.; Akim, N.I.J.; Roeffen, W.; Sauerwein, R.W. A Longitudinal Study of Immune Responses to *Plasmodium falciparum* Sexual Stage Antigens in Tanzanian Adults. *Parasite Immunol.* **2007**, *29*, 309–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baptista, B.O.; de Souza, A.B.L.; Riccio, E.K.P.; Bianco-Junior, C.; Totino, P.R.R.; Martins da Silva, J.H.; Theisen, M.; Singh, S.K.; Amoah, L.E.; Ribeiro-Alves, M.; 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. *Malar. J.* **2022**, *21*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Ministry of Health of Brazil. Epidemiological Situation of Malaria in Brazil. Available online: [https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/03/3.%20a%20-%20Situa%C3%A7%C3%A3o%20Epidemiol%C3%B3gica%20da%20Mal%C3%A1ria\\_Brasil\\_CIT\\_28.11.2018.pdf](https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/03/3.%20a%20-%20Situa%C3%A7%C3%A3o%20Epidemiol%C3%B3gica%20da%20Mal%C3%A1ria_Brasil_CIT_28.11.2018.pdf) (accessed on 15 December 2020).
22. Shute, G.T. The Microscopic Diagnosis of Malaria. In *Malaria: Principles and Practice of Malariology*; Wernsdorfer, W., McGregor, S., Eds.; Churchill Livingstone: New York, NY, USA, 1988; pp. 781–814.
23. Snounou, G. Detection and Identification of the Four Malaria Parasite Species Infecting Humans by PCR Amplification. *Methods Mol. Biol.* **1996**, *50*, 263–291. [[CrossRef](#)]
24. Ministry of Health of Brazil. Guide to Malaria Treatment in Brazil. Available online: [http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_tratamento\\_malaria\\_brasil.pdf](http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_tratamento_malaria_brasil.pdf) (accessed on 19 November 2020).
25. Larsen, J.E.P.; Lund, O.; Nielsen, M. Improved Method for Predicting Linear B-Cell Epitopes. *Immunome Res.* **2006**, *2*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Oeuvray, C.; Bouharoun-Tayoun, H.; Gras-Masse, H.; Bottius, E.; Kaidoh, T.; Aikawa, M.; Filgueira, M.; Tartar, A.; Druilhe, P. Merozoite Surface Protein-3: A Malaria Protein Inducing Antibodies That Promote *Plasmodium falciparum* Killing by Cooperation with Blood Monocytes. *Blood* **1994**, *84*, 1594–1602. [[CrossRef](#)]
27. Theisen, M.; Soe, S.; Jessing, S.G.; Okkels, L.M.; Danielsen, S.; Oeuvray, C.; Druilhe, P.; Jepsen, S. Identification of a Major B-Cell Epitope of the *Plasmodium falciparum* Glutamate-Rich Protein (GLURP), Targeted by Human Antibodies Mediating Parasite Killing. *Vaccine* **2000**, *19*, 204–212. [[CrossRef](#)]
28. Beutling, U.; Frank, R. Epitope Analysis Using Synthetic Peptide Repertoires Prepared by SPOT Synthesis Technology. In *Antibody Engineering*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; Volume 1, pp. 537–571.
29. Ghattas, M.; Dwivedi, G.; Lavertu, M.; Alameh, M.G. Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities. *Vaccines* **2021**, *9*, 1490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Noya, O.; Patarroyo, M.; Guzman, F.; de Noya, B. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, *4*, 299–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Shirai, H.; Prades, C.; Vita, R.; Marcatili, P.; Popovic, B.; Xu, J.; Overington, J.P.; Hirayama, K.; Soga, S.; Tsunoyama, K.; et al. Antibody Informatics for Drug Discovery. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1844*, 2002–2015. [[CrossRef](#)]
32. Doolan, D.L.; Dobaño, C.; Baird, J.K. Acquired Immunity to Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 13–36, Table of Contents. [[CrossRef](#)]
33. Gonzales, S.J.; Reyes, R.A.; Braddom, A.E.; Batugedara, G.; Bol, S.; Bunnik, E.M. Naturally Acquired Humoral Immunity Against *Plasmodium falciparum* Malaria. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 594653. [[CrossRef](#)]
34. Ministry of Health of Brazil. Boletim Epidemiológico. Available online: <http://portalsaude.saude.gov.br> (accessed on 11 November 2021).
35. Oeuvray, C.; Bouharoun-Tayoun, H.; Grass-Masse, H.; Iepers, J.P.; Ralamboranto, L.; Tartar, A.; Druilhe, P. A Novel Merozoite Surface Antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) Identified by Cellular-Antibody Cooperative Mechanism Antigenicity and Biological Activity of Antibodies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1994**, *89*, 77–80. [[CrossRef](#)]
36. Theisen, M.; Soe, S.; Oeuvray, C.; Thomas, A.W.; Vuust, J.; Danielsen, S.; Jepsen, S.; Druilhe, P. The Glutamate-Rich Protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* Is a Target for Antibody-Dependent Monocyte-Mediated Inhibition of Parasite Growth In Vitro. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 11–17. [[CrossRef](#)]
37. Nebie, I.; Diarra, A.; Ouedraogo, A.; Soulama, I.; Bougouma, E.C.; Tiono, A.B.; Konate, A.T.; Chilengi, R.; Theisen, M.; Dodo, D.; et al. Humoral Responses to *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Antigens and Association with Incidence of Clinical Malaria in Children Living in an Area of Seasonal Malaria Transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 759–766. [[CrossRef](#)]
38. Osier, F.H.A.; Fegan, G.; Polley, S.D.; Murungi, L.; Verra, F.; Tetteh, K.K.A.; Lowe, B.; Mwangi, T.; Bull, P.C.; Thomas, A.W.; et al. Breadth and Magnitude of Antibody Responses to Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Antigens Are Associated with Protection from Clinical Malaria. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2240–2248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Courtin, D.; Oesterholt, M.; Huismans, H.; Kusi, K.; Milet, J.; Badaut, C.; Gaye, O.; Roeffen, W.; Remarque, E.J.; Sauerwein, R.; 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**, *4*, e7590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Iriemenam, N.C.; Khirelsied, A.H.; Nasr, A.; ElGhazali, G.; Giha, H.A.; Elhassan A-Elgadir, T.M.; Agab-Aldour, A.A.; Montgomery, S.M.; Anders, R.F.; Theisen, M.; et al. Antibody Responses to a Panel of *Plasmodium falciparum* Malaria Blood-Stage Antigens in Relation to Clinical Disease Outcome in Sudan. *Vaccine* **2009**, *27*, 62–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Dodo, D.; Atuguba, F.; Bosompah, S.; Ansah, N.A.; Ansah, P.; Lamptey, H.; Egyir, B.; Oduro, A.R.; Gyan, B.; Hodgson, A.; et al. Antibody Levels to Multiple Malaria Vaccine Candidate Antigens in Relation to Clinical Malaria Episodes in Children in the Kasena-Nankana District of Northern Ghana. *Malar. J.* **2011**, *10*, 108. [[CrossRef](#)]
42. Guiyedi, V.; Bécavin, C.; Herbert, F.; Gray, J.; Cazenave, P.A.; Kombila, M.; Crisanti, A.; Fesel, C.; Pied, S. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* Infection in Children Is Associated with Increased Auto-Antibody Production, High IL-10 Plasma Levels and Antibodies to Merozoite Surface Protein 3. *Malar. J.* **2015**, *14*, 162. [[CrossRef](#)]

43. Pratt-Riccio, L.R.; Lima-Junior, J.C.; Carvalho, L.J.M.; Theisen, M.; Espíndola-Mendes, E.C.; Santos, F.; Oliveira-Ferreira, J.; Goldberg, A.C.; Daniel-Ribeiro, C.T.; Banic, D.M. 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*, 1096–1103. [[CrossRef](#)]
44. Carvalho, L.J.M.; Alves, F.A.; Bianco, C.; Oliveira, S.G.; Zanini, G.M.; Soe, S.; Druilhe, P.; Theisen, M.; Muniz, J.A.P.C.; Daniel-Ribeiro, C.T. Immunization of *Saimiri sciureus* Monkeys with a Recombinant Hybrid Protein Derived from the *Plasmodium falciparum* Antigen Glutamate-Rich Protein and Merozoite Surface Protein 3 Can Induce Partial Protection with Freund and Montanide ISA720 Adjuvants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2005**, *12*, 242–248. [[CrossRef](#)]
45. Pratt-Riccio, L.R.; de Perce-da-Silva, D.S.; Lima-Junior, J.d.C.; Theisen, M.; Santos, F.; Daniel-Ribeiro, C.T.; de Oliveira-Ferreira, J.; Banic, D.M. Genetic Polymorphisms in the Glutamate-Rich Protein of *Plasmodium falciparum* Field Isolates from a Malaria-Endemic Area of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2013**, *108*, 523–528. [[CrossRef](#)]
46. Ambrosino, E.; Dumoulin, C.; Orlandi-Pradines, E.; Remoue, F.; Toure-Baldé, A.; Tall, A.; Sarr, J.B.; Poinsignon, A.; Sokhna, C.; Puget, K.; et al. A Multiplex Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* Saliva Antigens. *Malar. J.* **2010**, *9*, 317. [[CrossRef](#)]
47. Singh, S.; Soe, S.; Mejia, J.P.; Roussillon, C.; Theisen, M.; Corradin, G.; Druilhe, P. Identification of a Conserved Region of *Plasmodium falciparum* MSP3 Targeted by Biologically Active Antibodies to Improve Vaccine Design. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1010–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Druilhe, P.; Spertini, F.; Soesoe, D.; Corradin, G.; Mejia, P.; Singh, S.; Audran, R.; Bouzidi, A.; Oeuvray, C.; Roussillon, C. A Malaria Vaccine That Elicits in Humans Antibodies Able to Kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med.* **2005**, *2*, e344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Nebie, I.; Diarra, A.; Ouedraogo, A.; Tiono, A.B.; Konate, A.T.; Gansane, A.; Soulama, I.; Cousens, S.; Leroy, O.; Sirima, S.B. Humoral and Cell-Mediated Immunity to MSP3 Peptides in Adults Immunized with MSP3 in Malaria Endemic Area, Burkina Faso. *Parasite Immunol.* **2009**, *31*, 474–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Yagi, M.; Bang, G.; Tougan, T.; Palacpac, N.M.Q.; Arisue, N.; Aoshi, T.; Matsumoto, Y.; Ishii, K.J.; Egwang, T.G.; Druilhe, P.; et al. Protective Epitopes of the *Plasmodium falciparum* SERA5 Malaria Vaccine Reside in Intrinsically Unstructured N-Terminal Repetitive Sequences. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98460. [[CrossRef](#)]
51. Tohmoto, T.; Takashima, E.; Takeo, S.; Morita, M.; Nagaoka, H.; Udonsangpetch, R.; Sattabongkot, J.; Ishino, T.; Torii, M.; Tsuboi, T. Anti-MSP11 IgG Inhibits *Plasmodium falciparum* Merozoite Invasion into Erythrocytes in Vitro. *Parasitol. Int.* **2019**, *69*, 25–29. [[CrossRef](#)]
52. Hill, D.L.; Wilson, D.W.; Sampaio, N.G.; Eriksson, E.M.; Ryg-Cornejo, V.; Harrison, G.L.A.; Uboldi, A.D.; Robinson, L.J.; Beeson, J.G.; Siba, P.; et al. Merozoite Antigens of *Plasmodium falciparum* Elicit Strain-Transcending Opsonizing Immunity. *Infect. Immun.* **2016**, *84*, 2175–2184. [[CrossRef](#)]
53. Kana, I.H.; Singh, S.K.; Garcia-Senosian, A.; Dodoo, D.; Singh, S.; Adu, B.; Theisen, M. Breadth of Functional Antibodies Is Associated with *Plasmodium falciparum* Merozoite Phagocytosis and Protection Against Febrile Malaria. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 275–284. [[CrossRef](#)]
54. Mbengue, B.; Fall, M.M.; Varela, M.L.; Loucoubar, C.; Joos, C.; Fall, B.; Niang, M.S.; Niang, B.; Mbow, M.; Dieye, A.; et al. Analysis of Antibody Responses to Selected *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Antigens in Mild and Cerebral Malaria and Associations with Clinical Outcomes. *Clin. Exp. Immunol.* **2019**, *196*, 86–96. [[CrossRef](#)]
55. Feng, G.; Boyle, M.J.; Cross, N.; Chan, J.-A.; Reiling, L.; Osier, F.; Stanisic, D.I.; Mueller, I.; Anders, R.F.; McCarthy, J.S.; et al. Human Immunization with a Polymorphic Malaria Vaccine Candidate Induced Antibodies to Conserved Epitopes That Promote Functional Antibodies to Multiple Parasite Strains. *J. Infect. Dis.* **2018**, *218*, 35–43. [[CrossRef](#)]
56. Reiling, L.; Boyle, M.J.; White, M.T.; Wilson, D.W.; Feng, G.; Weaver, R.; Opi, D.H.; Persson, K.E.M.; Richards, J.S.; Siba, P.M.; et al. Targets of Complement-Fixing Antibodies in Protective Immunity against Malaria in Children. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 610. [[CrossRef](#)]
57. Dobaño, C.; Santano, R.; Vidal, M.; Jiménez, A.; Jairoce, C.; Ubillos, I.; Dosoo, D.; Aguilar, R.; Williams, N.A.; Díez-Padrisa, N.; et al. Differential Patterns of IgG Subclass Responses to *Plasmodium falciparum* Antigens in Relation to Malaria Protection and RTS,S Vaccination. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 439. [[CrossRef](#)]
58. Theisen, M.; Dodoo, D.; Toure-Balde, A.; Soe, S.; Corradin, G.; Koram, K.K.; Kurtzhals, J.A.L.; Hviid, L.; Theander, T.; Akanmori, B.; et al. Selection of Glutamate-Rich Protein Long Synthetic Peptides for Vaccine Development: Antigenicity and Relationship with Clinical Protection and Immunogenicity. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 5223–5229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Scopel, K.K.G.; Fontes, C.J.F.; Ferreira, M.U.; Braga, E.M. Factors Associated with Immunoglobulin G Subclass Polarization in Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Proteins: A Cross-Sectional Survey in Brazilian Amazonia. *Clin. Vaccine Immunol.* **2006**, *13*, 810–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Tangye, S.G.; Ferguson, A.; Avery, D.T.; Ma, C.S.; Hodgkin, P.D. Isotype Switching by Human B Cells Is Division-Associated and Regulated by Cytokines. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4298–4306. [[CrossRef](#)]
61. Cassiano, G.C.; Furini, A.A.C.; Capobianco, M.P.; Storti-Melo, L.M.; Cunha, M.G.; Kano, F.S.; Carvalho, L.H.; Soares, I.S.; Santos, S.E.; Póvoa, M.M.; et al. Polymorphisms in B Cell Co-Stimulatory Genes Are Associated with IgG Antibody Responses against Blood-Stage Proteins of *Plasmodium vivax*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Stone, W.J.R.; Campo, J.J.; Ouédraogo, A.L.; Meerstein-Kessel, L.; Morlais, I.; Da, D.; Cohuet, A.; Nsango, S.; Sutherland, C.J.; van de Vegte-Bolmer, M.; et al. Unravelling the Immune Signature of *Plasmodium falciparum* Transmission-Reducing Immunity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 558. [[CrossRef](#)]
63. Stone, W.J.R.; Dantzer, K.W.; Nilsson, S.K.; Drakeley, C.J.; Marti, M.; Bousema, T.; Rijpma, S.R. Naturally Acquired Immunity to Sexual Stage *P. falciparum* Parasites. *Parasitology* **2016**, *143*, 187–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Roeffen, W.; Teelen, K.; van As, J.; vd Vegte-Bolmer, M.; Eling, W.; Sauerwein, R. *Plasmodium falciparum*: Production and Characterization of Rat Monoclonal Antibodies Specific for the Sexual-Stage Pfs48/45 Antigen. *Exp. Parasitol.* **2001**, *97*, 45–49. [[CrossRef](#)]
65. de Jong, R.M.; Meerstein-Kessel, L.; Da, D.F.; Nsango, S.; Challenger, J.D.; van de Vegte-Bolmer, M.; van Gemert, G.J.; Duarte, E.; Teyssier, N.; Sauerwein, R.W.; et al. Monoclonal Antibodies Block Transmission of Genetically Diverse *Plasmodium falciparum* Strains to Mosquitoes. *NPJ Vaccines* **2021**, *6*, 101. [[CrossRef](#)]
66. Singh, S.K.; Plieskatt, J.; Chourasia, B.K.; Fabra-García, A.; Garcia-Senosiain, A.; Singh, V.; Bengtsson, K.L.; Reimer, J.M.; Sauerwein, R.; Jore, M.M.; et al. A Reproducible and Scalable Process for Manufacturing a Pfs48/45 Based *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 606266. [[CrossRef](#)]
67. Biswas, S.; Seth, R.K.; Tyagi, P.K.; Sharma, S.K.; Dash, A.P. Naturally Acquired Immunity and Reduced Susceptibility to *falciparum* Malaria in Two Subpopulations of Endemic Eastern India. *Scand. J. Immunol.* **2008**, *67*, 177–184. [[CrossRef](#)]
68. Balam, S.; Olugbile, S.; Servis, C.; Diakité, M.; D'Alessandro, A.; Frank, G.; Moret, R.; Nebie, I.; Tanner, M.; Felger, I.; et al. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 2: Epitope Mapping and Fine Specificity of Human Antibody Response against Non-Polymorphic Domains. *Malar. J.* **2014**, *13*, 510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Nixon, C.E.; Park, S.; Pond-Tor, S.; Raj, D.; Lambert, L.E.; Orr-Gonzalez, S.; Barnafo, E.K.; Rausch, K.M.; Friedman, J.F.; Fried, M.; et al. Identification of Protective B-Cell Epitopes within the Novel Malaria Vaccine Candidate *Plasmodium falciparum* Schizont Egress Antigen 1. *Clin. Vaccine Immunol.* **2017**, *24*, e00068-17. [[CrossRef](#)]
70. Sanchez-Trincado, J.L.; Gomez-Perosanz, M.; Reche, P.A. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J Immunol. Res.* **2017**, *2017*, 2680160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Lee, S.M.; Hickey, J.M.; Miura, K.; Joshi, S.B.; Volkin, D.B.; King, C.R.; Plieskatt, J.L. A C-Terminal Pfs48/45 Malaria Transmission-Blocking Vaccine Candidate Produced in the Baculovirus Expression System. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 395. [[CrossRef](#)]
72. Lennartz, F.; Brod, F.; Dabbs, R.; Miura, K.; Mekhaie, D.; Marini, A.; Jore, M.M.; Søgaard, M.M.; Jørgensen, T.; de Jongh, W.A.; et al. Structural Basis for Recognition of the Malaria Vaccine Candidate Pfs48/45 by a Transmission Blocking Antibody. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Kurtovic, L.; Boyle, M.J.; Opi, D.H.; Kennedy, A.T.; Tham, W.; Reiling, L.; Chan, J.; Beeson, J.G. Complement in Malaria Immunity and Vaccines. *Immunol. Rev.* **2020**, *293*, 38–56. [[CrossRef](#)]
74. Ouédraogo, A.L.; Eckhoff, P.A.; Luty, A.J.F.; Roeffen, W.; Sauerwein, R.W.; Bousema, T.; Wenger, E.A. Modeling the Impact of *Plasmodium falciparum* Sexual Stage Immunity on the Composition and Dynamics of the Human Infectious Reservoir for Malaria in Natural Settings. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007034. [[CrossRef](#)]
75. Ayanful-Torgby, R.; Sarpong, E.; Abagna, H.B.; Donu, D.; Obboh, E.; Mensah, B.A.; Adjah, J.; Williamson, K.C.; Amoah, L.E. Persistent *Plasmodium falciparum* Infections Enhance Transmission-Reducing Immunity Development. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21380. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### 3.3. Resultados complementares

#### 3.3.1. Ensaio de Imunofluorescência

Anticorpos IgG de 20 indivíduos das áreas endêmicas de malária estudadas com altos níveis de anticorpos IgG específicos contra GLURP e MSP-3 foram purificados por cromatografia de afinidade usando colunas *Hi-Trap Proteína G* de 1mL (*GE Healthcare Life Sciences*), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, amostras de plasma foram centrifugadas (14.000 RPM por 5 minutos), o sobrenadante foi filtrado em um filtro de 0.45µm (*Millipore*) e adicionado numa coluna equilibrada com tampão fosfato de sódio 0.02M, pH 7, a uma taxa de fluxo de 1mL/min. A fração IgG foi eluída com tampão 0.1M glicina/HCL, pH 2.7, com a mesma taxa de fluxo. As frações eluídas foram imediatamente neutralizadas com 1M Tris/HCL, pH 9, e dialisadas contra PBS. Os anticorpos específicos anti-GLURP e -MSP-3 foram purificados do IgG total por cromatografia de afinidade utilizando colunas *Hi-Trap NHS-activated* de 1mL (*GE Healthcare Life Sciences*) contendo 1mg de GLURP-R0 ou MSP-3-C-terminal acoplados a coluna de acordo com as instruções do fabricante. IgG total foi adicionado nas colunas com GLURP e MSP-3 equilibrada com tampão fosfato de sódio 0.02M, pH 7, a uma taxa de fluxo de 1mL/min. Anticorpos IgG específicos ligados a coluna foram eluídos com tampão 0.1M glicina/HCL, pH 2.7, com a mesma taxa de fluxo. As frações eluídas foram imediatamente neutralizadas com 1M Tris/HCL, pH 9, e dialisadas contra PBS. Também foram purificados anticorpos IgG do plasma de 5 indivíduos de área não endêmica de malária no Rio de Janeiro (NIG - controle negativo) e de 1 *pool* de imunoglobulinas de Africanos hiperimunes (PIAG – controle positivo). Os anticorpos purificados foram esterilizados em filtro 0.22µm (*Millipore*), quantificados utilizando NanoDrop™ Lite (*Thermo Fisher Scientific*) e armazenados a -20°C até a sua utilização.

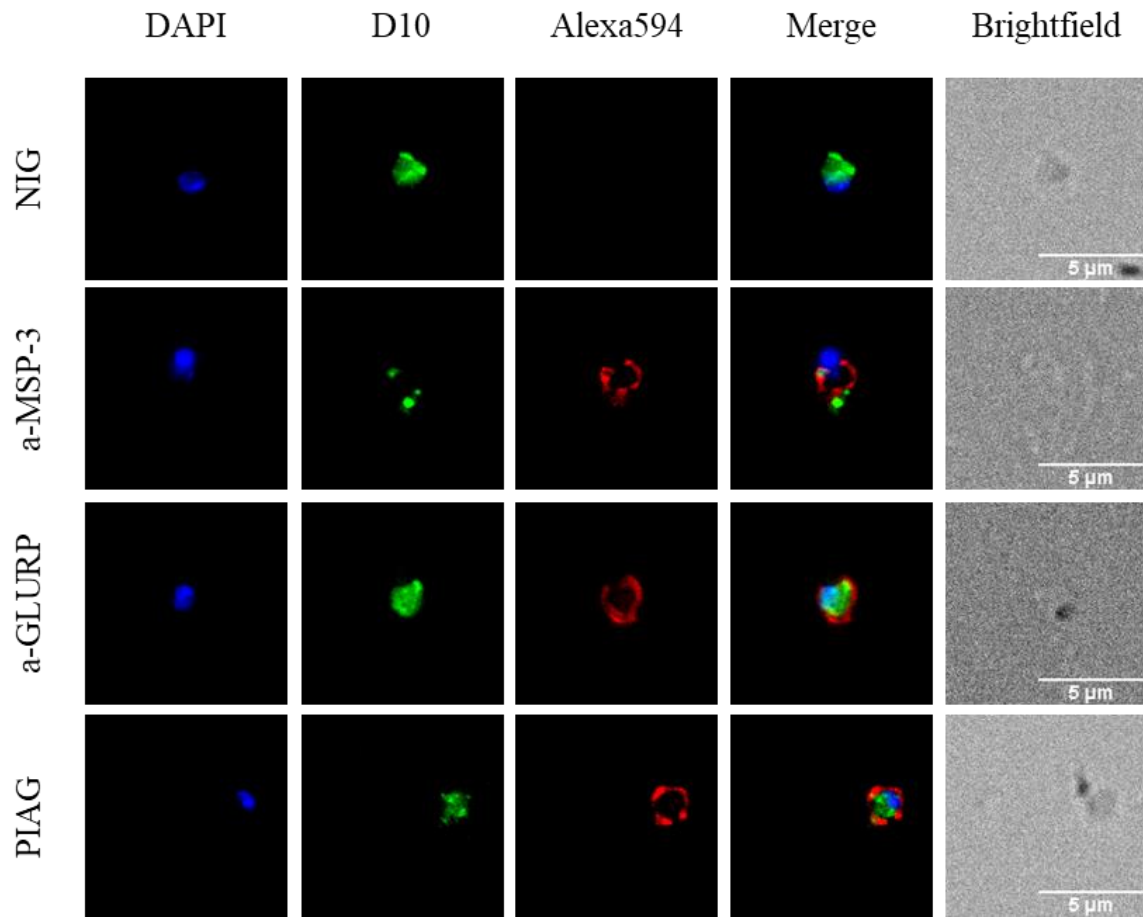
Os parasitos *Plasmodium falciparum* (cepa D10) foram cultivados em hemácias humanas do tipo O+, em um hematócrito de 4% em meio RPMI-HEPES (*Sigma-Aldrich*) suplementado com 0.5% (w/v) de Albumax™ (*Invitrogen*), e mantidos a 37°C na mistura ideal de gases (5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>) (160). A cultura foi sincronizada pelo tratamento com sorbitol (*Sigma-Aldrich*), como descrito



anteriormente (161). O isolamento dos merozoítos foi realizado como descrito previamente (162), esquizontes foram tratados com 10µM do inibidor de protease E64 (*Sigma-Aldrich*) por cerca de 12 horas. Após isso, a cultura foi filtrada em filtro de 1.2µm/32mm (*Millipore*) e a hemozoína foi removida através da passagem do filtrado em coluna magnética LS (*Miltenyi Biotec*).

Os merozoítos isolados foram incubados por 1h com 100 µg/ml de anticorpos purificados anti-MSP-3 ou -GLURP, além de IgG total dos controles positivo e negativo à 37°C. O complexo merozoítos e anticorpos foi lavado 3 vezes com tampão fosfato salina 1X (*Phosphate Buffered Saline – PBS*) e fixado nas lâminas com 4% de paraformaldeído (*ProSciTech*) por 30 minutos. Após secagem, as lâminas foram bloqueadas com PBS 1x contendo 3% de Albumina de Soro Bovina (*Bovine Serum Albumin – BSA*) (*Sigma-Aldrich*) por 1h. As lâminas foram lavadas com PBS 1X e incubadas com anticorpo anti-IgG humana diluído (1:2000) em PBS 1X contendo 3% de BSA por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa594 diluído (1:1000) em PBS 1X contendo 3% de BSA por 30 minutos. As lâminas foram lavadas, montadas em meio de montagem Vectashield (*Vecta Laboratories*) contendo 0.1 µg/ml 4', 6–diamidino-2-phenylindole (DAPI, *Invitrogen*), seladas e mantidas a 4°C sob o abrigo de luz até a obtenção das imagens. As imagens foram capturas utilizando o microscópio invertido *Nikon Eclipse Ti Confocal* (*Nikon*) com a objetiva de 100x 1.45, e tratadas utilizando o software ImageJ (*National Institute of Health*).

Verificamos que os anticorpos IgG naturalmente adquiridos dirigidos às regiões R0 da GLURP e C-terminal da MSP-3 de indivíduos residentes nas áreas endêmicas estudadas e as IgGs purificadas do controle positivo reconheceram a proteína nativa em ensaios de imunofluorescência. Como esperado, as IgGs purificadas do controle negativo não reconheceram o parasito (Figura 10).



**Figura 10: Anticorpos anti-GLURP e anti-MSP-3 são capazes de reconhecer a proteína nativa do parasito.** NIG: Controle negativo; PIAG: Controle positivo. Barra de escala representa 5 µm.

### 3.3.2. Avaliação da resposta imune celular contra a proteína GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e Pfs48/45).

Aproximadamente 16mL de sangue foram coletados por via endovenosa em tubos vacuntainer com heparina (Becton & Dickinson). As células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral blood mononuclear cells* - PBMCs) foram isoladas por centrifugação em gradiente *ficoll-hypaque* usando o Histopaque densidade 1,077g/ml (*Sigma-Aldrich*), na proporção 2:1 e centrifugado por 30 minutos a 400 x g à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com PBS 1X, ressuspendidas em Soro Fetal Bovino (SFB) (*Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.*) inativado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*) e transferidas para tubos de criopreservação. Os tubos foram armazenados em recipientes Mr. Frosty™

(Nalgene, Sigma-Aldrich) à -70°C por pelo menos 12 horas e transferidas para o nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), onde permaneceram até o momento do uso.

O descongelamento das amostras criopreservadas foi realizado pela imersão em banho-maria a 37°C, seguido da adição de 0,5mL, 1mL, 2mL e 4mL de solução de descongelamento (RPMI 1640 contendo 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB) em intervalos de 1 minuto. Após isso, as amostras foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 completo (10mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 1mM de piruvato de sódio (Gibco Industries, Inc.), 200U/mL de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina (Gibco Industries, Inc.), 55µM de 2-mercaptoetanol (Gibco Industries, Inc.) e 2g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de SFB) para contagem das células. Para a contagem das células, 5µL de suspensão celular foram adicionados em 95µL de azul de tripan 0.2% (Sigma-Aldrich). Um volume de 10µL dessa solução foi adicionado na câmara de Neubauer (Bright-line, Electron Microscopy Sciences) e células viáveis e não viáveis foram contadas em microscópio ótico (Olympus BH2, Global Medical Instrumentation Inc.) em aumento de 40X. As amostras foram ajustadas para 2,5 x 10<sup>5</sup> de células/100µL para posterior utilização para avaliação das populações celulares *ex-vivo* e após cultura na ausência e presenças dos estímulos GMZ2.6c (10µg/mL), GLURP-R0 (10µg/mL), MSP-3-C-terminal (10µg/mL) e Pfs48/45-6C (10µg/mL), e os mitógenos PMA (50ng/mL) e Ionomicina (250ng/mL) por 96 horas à 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, e ELISpot para mapeamento dos epítomos de célula T.

### **3.3.2.1. Imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias**

Para a imunofenotipagem das populações linfocitárias por citometria de fluxo, as células (*ex vivo* e após cultura celular) de 18 indivíduos expostos a infecção não parasitados (Grupo EXP) e 8 indivíduos parasitados por *P. falciparum* (Grupo PF) foram incubadas com 100µL de PBS 1X suplementado com 1% de SFB contendo anticorpos monoclonais direcionados a moléculas de superfície celular por 40 minutos à 4°C sob o abrigo da luz (Anti-CD69 PE-Cy, anti-CD3 APC-H7, anti-CD4 PE, anti-CD8 BV650, anti-CD19 BV421, anti-CD4 PerCP Cy 5.5, anti-CD45 RA PE-Cy7, anti-CD45 RO BB515, anti-CD197 PE e anti-CD62L APC – BD cat – 335792,

56016, 561844, 563821, 562440, 560650, 560675, 564529, 560765 e 559772, respectivamente, *BD Biosciences*). Após a marcação, as células *ex vivo* foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 2% (*Sigma-Aldrich*) por 30 minutos, lavadas, ressuspensas em 300µL de PBS 1X e mantidas a 4°C sob o abrigo da luz até serem adquiridas. As células provenientes da cultura celular, após marcação, foram lavadas e incubadas com 100µL de tampão de Anexina V contendo Anexina V e 7-AAD (*BD Biosciences*) por 15 minutos à 4°C sob o abrigo da luz, ressuspensas em 300µL de tampão de anexina V e rapidamente adquiridas. As células foram adquiridas pelo citômetro de fluxo CytoFlex (*BeckmanCoulter*) da Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz e os dados obtidos foram analisados no software Flow Jo (*TreeStar*). As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPadPrism (*GraphPad Software, Inc*) e as diferenças foram verificadas pelos testes One-Way ANOVA seguido do Tukey's posttest para múltiplas análises e teste *T de Student* para diferenças entre dois grupos, sendo um valor de  $p < 0.05$  considerado estatisticamente significativo.

#### **3.3.2.1.1. Características da população estudada**

A resposta celular foi avaliada em indivíduos expostos não infectados e infectados por *P. falciparum*. Não observamos quaisquer diferenças em relação a gênero, idade, tempo de residência em área endêmica, número de episódios anteriores e tempo decorrido desde a última infecção de malária (Tabela 2).

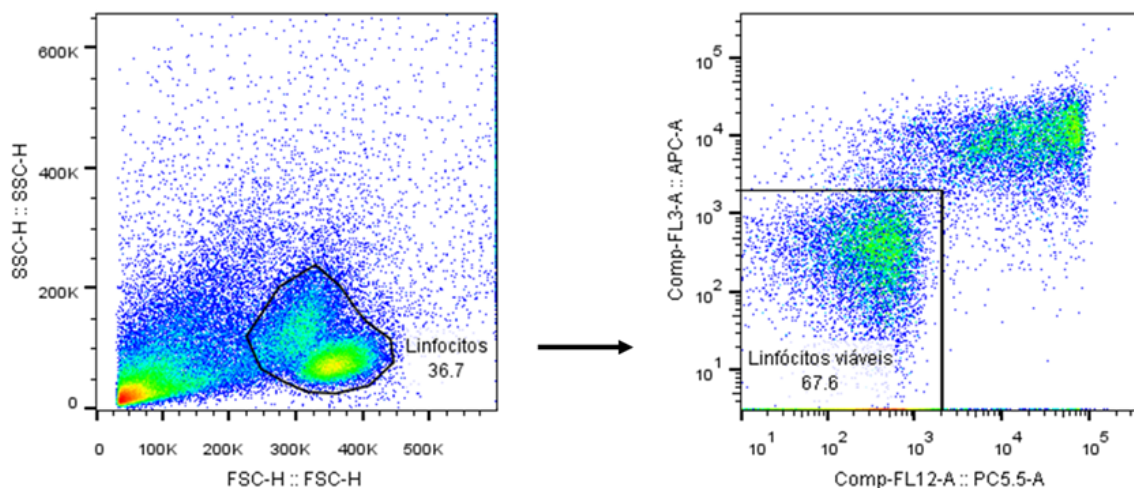
**Tabela 2: Características pessoais e epidemiológicas dos grupos EXP e PF para avaliação da resposta imune celular contra as proteínas recombinantes GMZ2,6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45.**

		EXP (n=18)	PF (n=8)
<b>Dados pessoais</b>			
Gênero	Masculino	11 (61.1%)	4 (50%)
	Feminino	7 (38.9%)	4 (50%)
Idade		32.9 ± 16.2	36.3 ± 11.2
Tempo de residência em área endêmica de malária (anos)		30.8 ± 17	28.7 ± 16.2
<b>Dados clínicos e epidemiológicos</b>			
Número de episódios anteriores de malária		9 ± 7.4	15.3 ± 9.3
Tempo decorrido desde o último episódio de malária (meses)		34.1 ± 28.4	12.2 ± 10.5

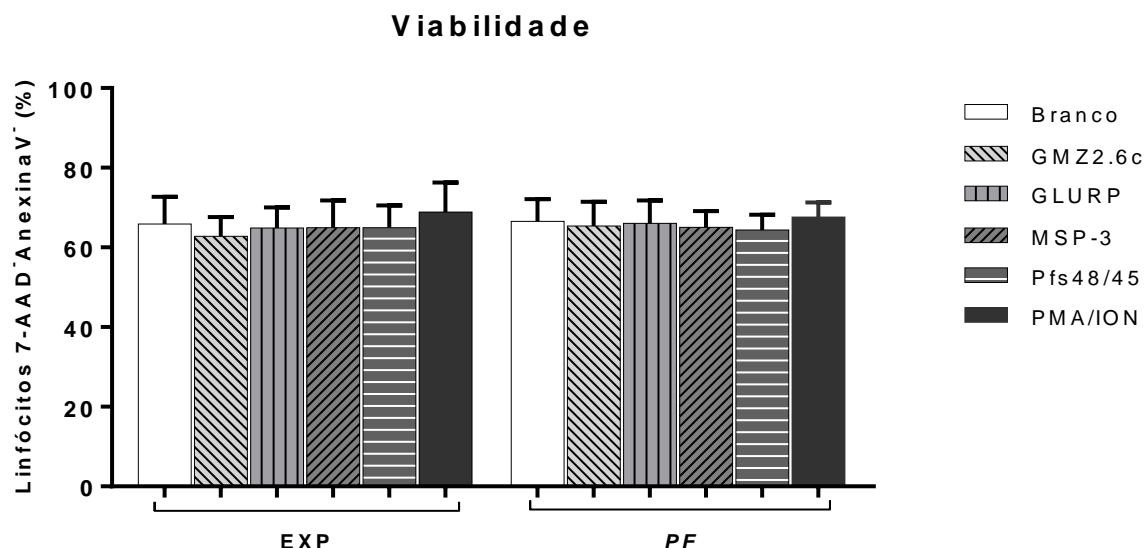
### 3.3.2.1.2. Avaliação da viabilidade celular ex vivo e após cultivo de 96h

A viabilidade das células mononucleares de sangue periférico foi avaliada pela contagem de células coradas por azul de tripan após o descongelamento. Indivíduos expostos não infectados apresentaram uma maior frequência de células viáveis (93.78% ± 0.95) quando comparado aos indivíduos parasitados por *P. falciparum* (90% ± 1.35) ( $p = 0.039$ ).

Após o cultivo de 96h, as PBMCs foram marcadas com 7-AAD e Anexina V e a análise da viabilidade celular foi realizada por citometria de fluxo (Figura 11). Nenhuma diferença significativa foi observada entre a frequência de linfócitos viáveis de indivíduos dos grupos EXP e PF após o cultivo de 96h na ausência ou presença de diferentes estímulos (Figura 12).



**Figura 11:** Representação gráfica da estratégia utilizada para quantificar o percentual de linfócitos viáveis (7-AAD<sup>-</sup>Anexina V<sup>-</sup>) após cultura de 96h na ausência ou presença de diferentes estímulos.

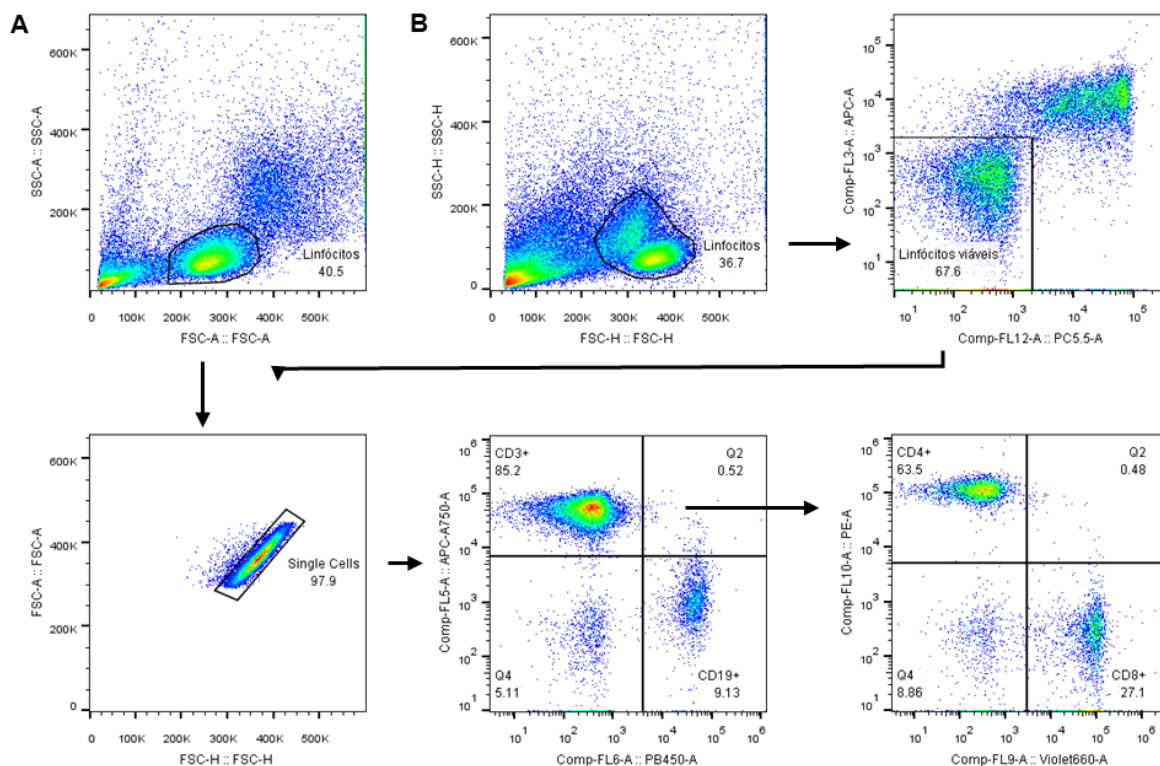


**Figura 12:** Avaliação da viabilidade celular após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina. As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; PF: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*.

Nossos resultados mostraram uma redução na viabilidade celular após a cultura de 96h quando comparado a viabilidade após o descongelamento, e essa redução da viabilidade é independente da presença ou do estímulo utilizado.

### 3.3.2.1.3. Avaliação das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B

As populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B (CD19<sup>+</sup>) de indivíduos expostos não parasitados e parasitados por *P. falciparum* *ex vivo* e estimuladas por 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, *Pfs48/45* e PMA/ionomicina foram avaliadas por citometria de fluxo (Figura 13).



**Figura 13: Representação gráfica das estratégias de *gates* utilizadas para a quantificação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) e B (CD19<sup>+</sup>) *ex vivo* (A) e após cultura de 96h na ausência ou presença de diferentes estímulos (B).**

Nos experimentos *ex vivo*, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram encontrados em maior frequência quando comparadas com os linfócitos T CD8<sup>+</sup> ( $p < 0.0005$ ) e linfócitos B ( $p < 0.0005$ ) nos grupos estudados. Da mesma forma, linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram encontrados em maior frequência quando comparados aos linfócitos B nos grupos EXP ( $p < 0.0005$ ) e PF ( $p = 0.0006$ ). Não observamos nenhuma diferença significativa entre as frequências de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B nos grupos estudados (Tabela 3).

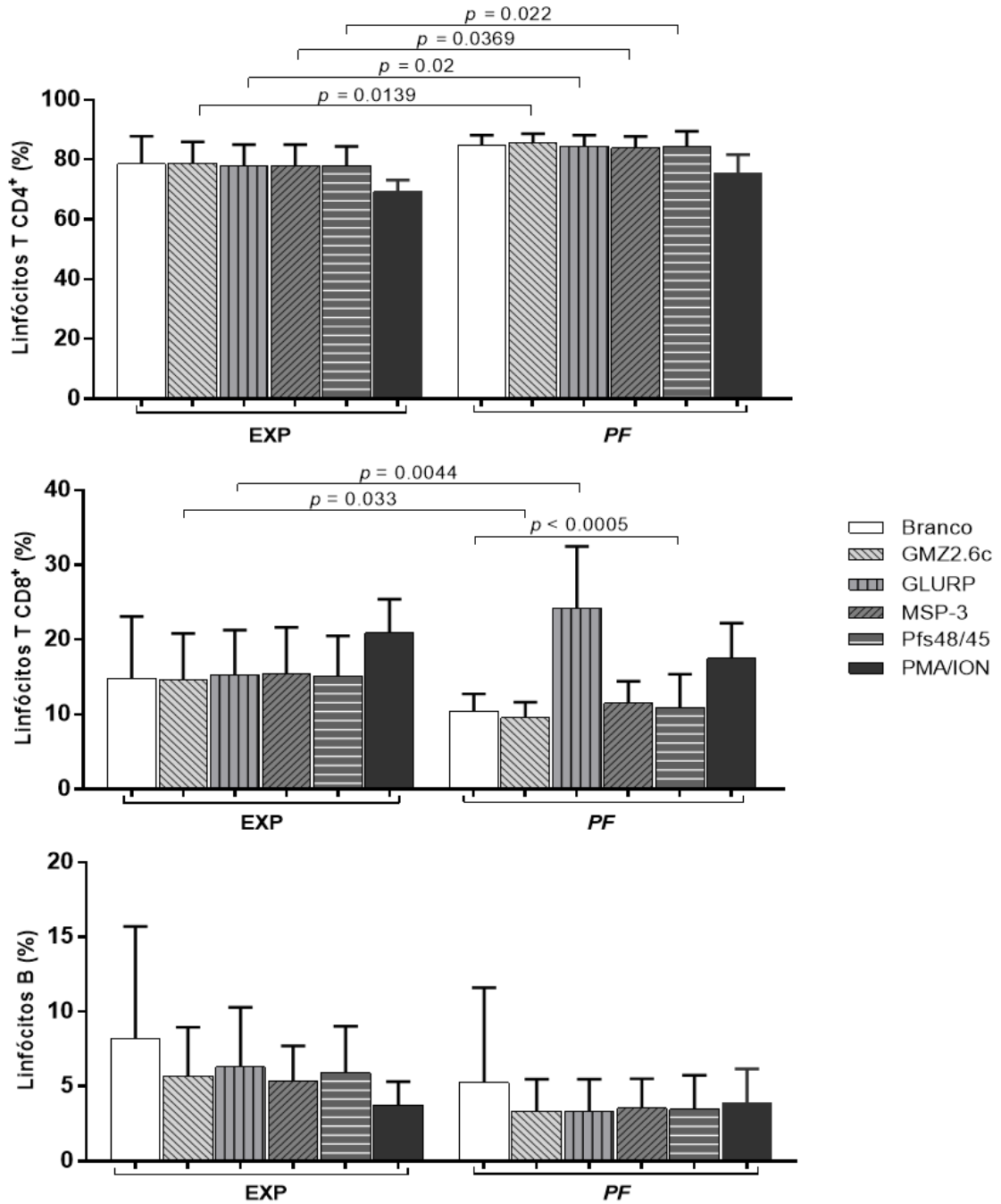
**Tabela 3: Frequências de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B *ex vivo* dos indivíduos dos grupos EXP e PF.**

Linfócitos	EXP	PF
T CD4 <sup>+</sup> (%)	68.03 ± 8.99	71.91 ± 6.29
T CD8 <sup>+</sup> (%)	24.34 ± 7.4	22.03 ± 4.74
B (%)	11.51 ± 3.99	9.74 ± 5.41

EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; PF: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*.

Não observamos diferença significativa no percentual de células T CD4<sup>+</sup> na ausência ou presença dos diferentes estímulos nos grupos estudados. Entretanto, indivíduos do grupo PF apresentaram maiores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> após os estímulos com GMZ2.6c ( $p = 0.0139$ ), GLURP ( $p = 0.02$ ), MSP-3 ( $p = 0.0369$ ) e Pfs48/45 ( $p = 0.022$ ) quando comparados com indivíduos do grupo EXP. Indivíduos do grupo EXP apresentaram percentuais semelhantes de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na ausência ou presença de diferentes estímulos, enquanto um maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no grupo PF foi observado após o estímulo com GLURP quando comparado as células não estitumuladas e estimuladas com GMZ2.6c, MSP-3 e Pfs48/45 ( $p < 0.0005$  para todas as análises). Quando comparamos as frequências de células T CD8<sup>+</sup> entre os dois grupos, observamos um menor percentual no grupo PF após o estímulo com a GMZ2.6c ( $p = 0.033$ ) e maior percentual após o estímulo com a GLURP ( $p = 0.004$ ). Não observamos diferenças significativas entre o percentual de linfócitos B nos dois grupos estudados na ausência ou presença dos diferentes estímulos (Figura 14).





**Figura 14: Avaliação das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e B após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionicina.** As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; PF: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*.

### 3.3.2.1.4. Avaliação da ativação celular *ex vivo* e após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina

A ativação celular *ex vivo* e após cultura na ausência ou presença de diferentes estímulos foi avaliada através da expressão do marcador de ativação CD69 por citometria de fluxo (Figura 15).

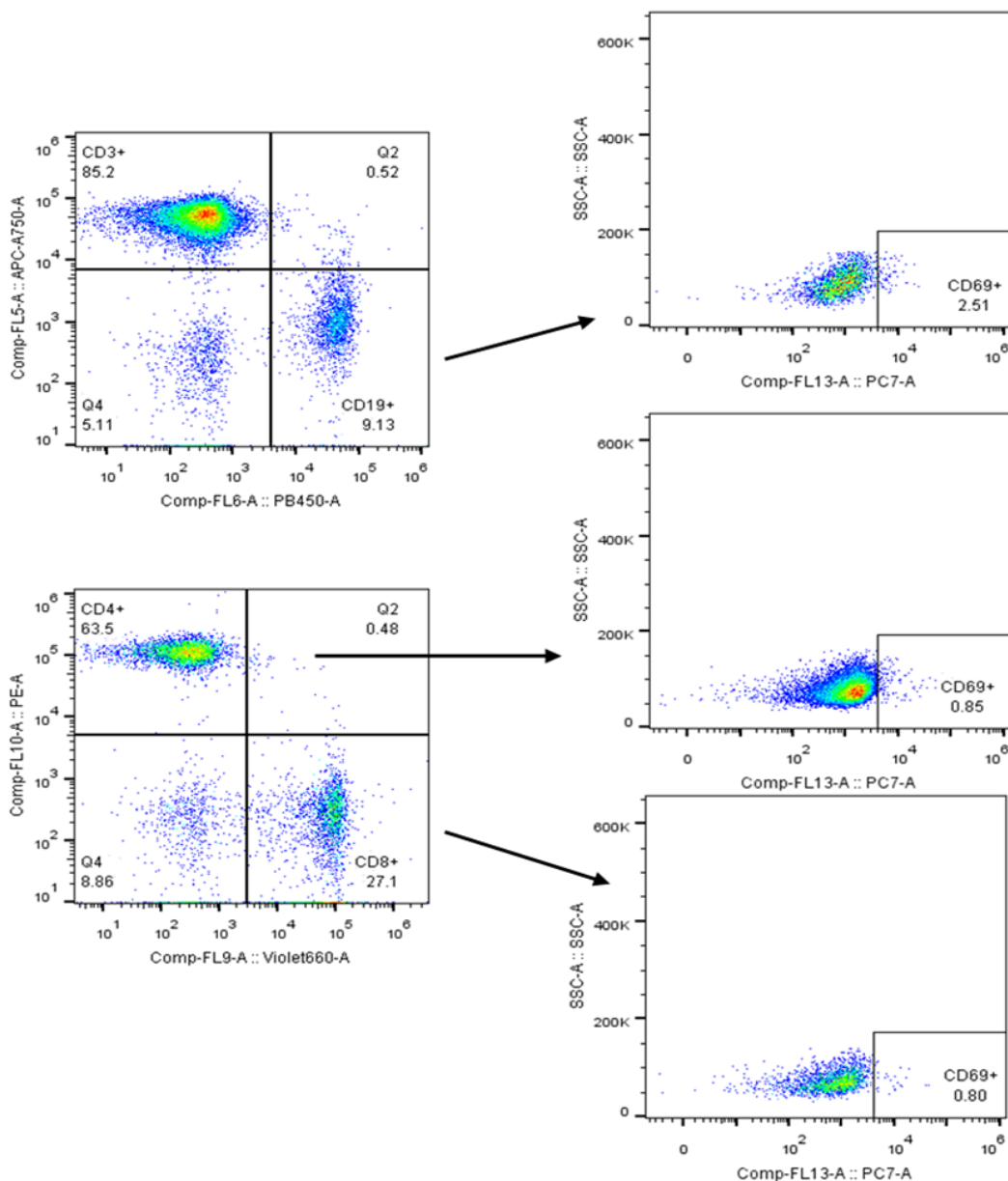


Figura 15: Representação gráfica das estratégias de *gates* utilizadas para a quantificação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) e B (CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) ativados.

Os grupos EXP e PF apresentaram perfis semelhantes de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *ex vivo*, entretanto observamos maiores percentuais de ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ( $p = 0.001$ ) e B ( $p = 0.008$ ) no grupo PF quando comparado ao grupo EXP. Após o cultivo de 96h, podemos observar um maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e B ativados na ausência ( $p = 0.0122$  e  $p = 0.0026$  para linfócitos T CD4<sup>+</sup> e B, respectivamente) e presença do estímulo GMZ2.6c ( $p = 0.0204$  e  $p = 0.0162$  para linfócitos T CD4<sup>+</sup> e B, respectivamente) no grupo PF quando comparado ao grupo EXP, enquanto nenhuma diferença estatística foi observada no perfil de ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos dois grupos na ausência ou presença de diferentes estímulos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e B estimulados com GLURP, MSP-3 e Pfs48/45. Adicionalmente, verificamos um menor percentual de linfócitos B ativados nas células *ex vivo* quando comparadas as células estimuladas com GMZ2.6c ( $p = 0.0292$ ) e Pfs48/45 ( $p = 0.0119$ ) no grupo PF (Tabela 4).

**Tabela 4: Ativação celular dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B de indivíduos dos grupos EXP e PF *ex vivo* e após 96h de cultura na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionicina.**

	EXP			PF		
	CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>
<i>Ex vivo</i>	0.46 ± 0.4	0.59 ± 0.4	1.74 ± 1.8	0.43 ± 0.2	1.21 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.72 ± 0.8 <sup>b,*</sup>
Branco	0.56 ± 0.2	2.09 ± 2.1	4.1 ± 3.2	0.79 ± 0.2 <sup>c</sup>	2.89 ± 2.4	7.58 ± 3.3 <sup>d</sup>
GMZ2.6c	0.49 ± 0.3	2.98 ± 2.9	5.16 ± 4.1	0.92 ± 0.2 <sup>e</sup>	4.3 ± 4.8	9.89 ± 4.8 <sup>f</sup>
GLURP	0.49 ± 0.3	2.14 ± 2.2	3.98 ± 3.6	0.65 ± 0.2	3.22 ± 2.5	6.87 ± 2.6
MSP-3	0.58 ± 0.4	3.11 ± 3.5	7.05 ± 6.7	0.87 ± 0.2	3.56 ± 3.3	9.28 ± 4.2
Pfs48/45	0.89 ± 1.2	3.32 ± 4.1	6.04 ± 5.6	1.11 ± 0.3	4.84 ± 4.6	10.51 ± 5.9
PMA/Ion	83.23 ± 5.2	87.1 ± 10.7	87.89 ± 12.9	77 ± 11.2	88.46 ± 7.2	96.65 ± 2.1

EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; PF: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*; Ion: Ionicina. <sup>a</sup>  $p = 0.001$  CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> PF versus EXP *ex vivo*; <sup>b</sup>  $p = 0.008$  CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> PF versus EXP *ex vivo*; <sup>c</sup>  $p = 0.0122$  CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> PF versus EXP e <sup>d</sup>  $p = 0.0026$  CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> PF versus EXP sem estímulo; <sup>e</sup>  $p = 0.0204$  CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> PF versus EXP e <sup>f</sup>  $p = 0.0162$  CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> PF versus EXP GMZ2.6c; <sup>\*</sup>  $p = 0.0292$  CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> *ex vivo* versus GMZ2.6c e  $p = 0.0119$  CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> *ex vivo* versus Pfs48/45.

### 3.3.2.1.5. Caracterização funcional das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ex vivo

As subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram caracterizadas como *naive* (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>), em transição *naive*/memória (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) e memória (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) de acordo com a expressão das diferentes isoformas do antígeno leucocitário comum CD45RA e CD45RO. Além disso, as células T de memória foram caracterizadas como células de memória central (CD197<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) e memória efetora (CD197<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) de acordo com a expressão das moléculas CCR7 e CD62L (Figura 16).

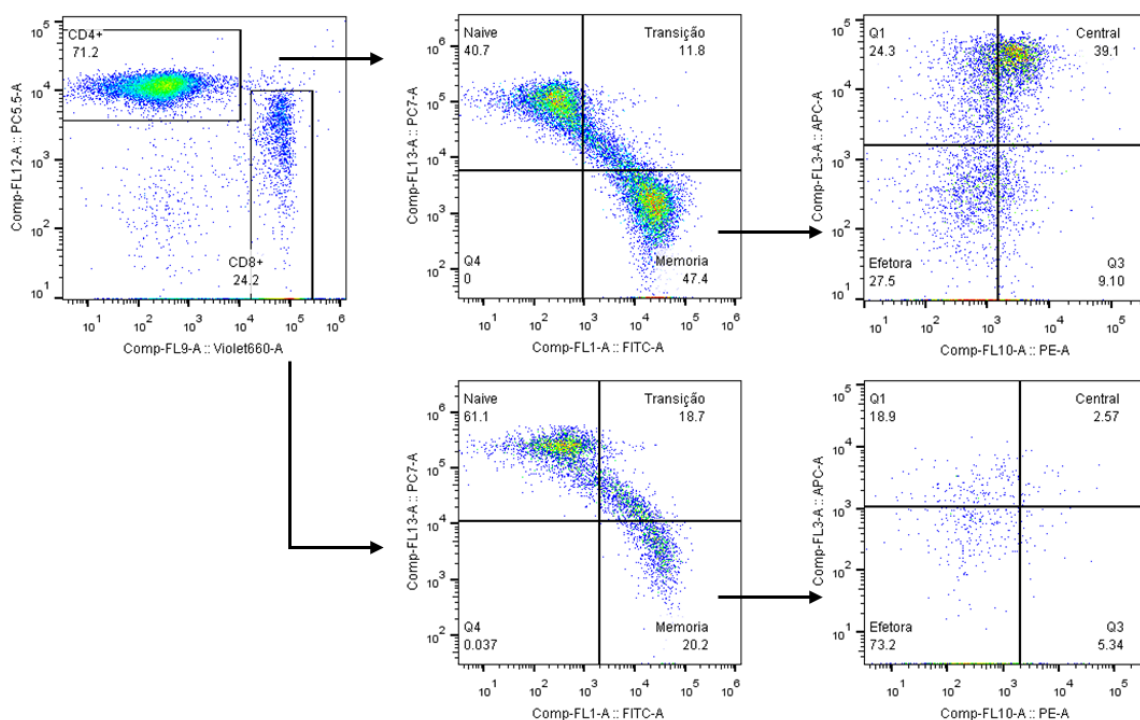
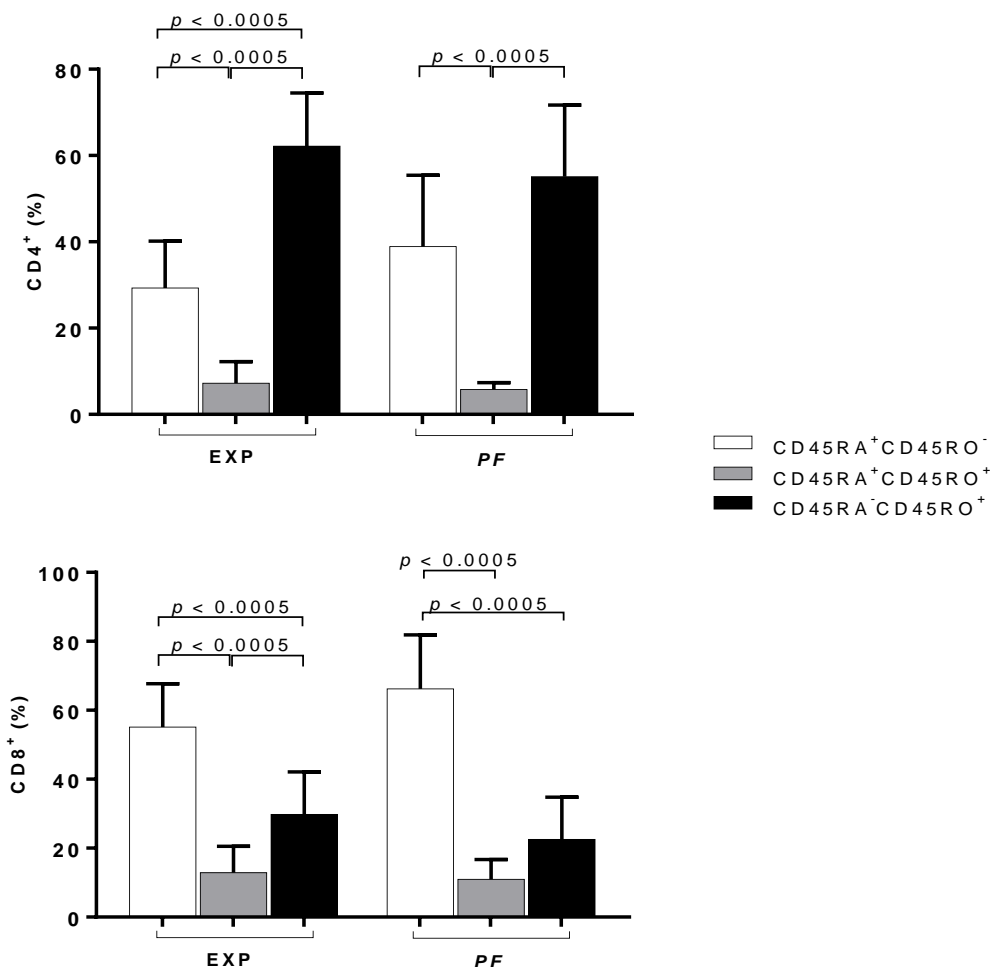


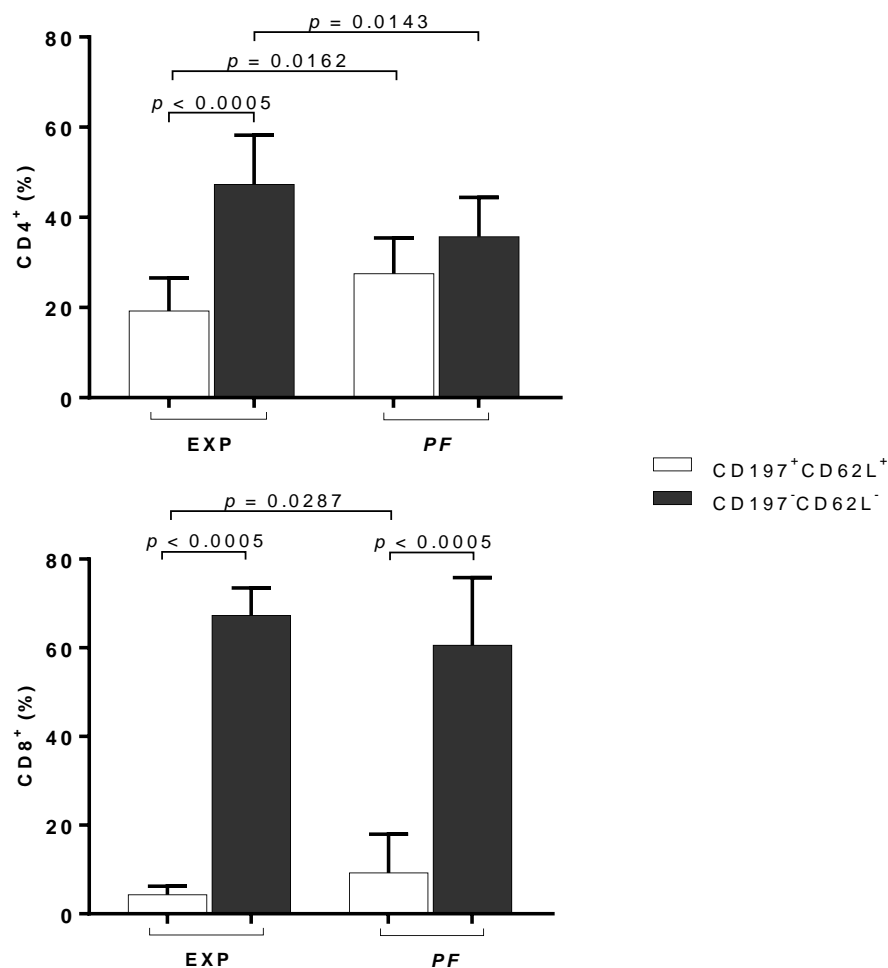
Figura 16: Representação gráfica das estratégias de *gates* utilizadas para a quantificação do percentual das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> *naive* (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>), em transição *naive*/memória (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) e de memória (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>), assim como as subpopulações de linfócitos T de memória central (CD45RO<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) e efetora (CD45RO<sup>+</sup>CD197<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>).

A caracterização de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> demonstrou percentuais semelhantes de células *naive*, em transição *naive*/memória e de memória nos dois grupos estudados. Nos grupos EXP e PF um menor percentual de células T CD4<sup>+</sup> em transição *naive*/memória foi observado quando comparado aos percentuais de células T CD4<sup>+</sup> *naive* e de memória ( $p < 0.005$  para todas as análises). Entretanto, somente no grupo EXP um maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória quando comparado ao percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naive* foi observado ( $p < 0.0005$ ). Em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, observamos maiores percentuais de células T CD8<sup>+</sup> *naive* nos dois grupos estudados ( $p < 0.0005$  para todas as análises). Contudo, somente o grupo exposto apresentou um maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória quando comparado ao percentual de células T CD8<sup>+</sup> em transição *naive*/memória ( $p < 0.0005$ ) (Figura 17).



**Figura 17: Subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> *naive*, em transição *naive*/memória e de memória nos grupos EXP e PF *ex vivo*.** As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; PF: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*. CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>: *naive*; CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>: Transição *naive*/memória; CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>: memória.

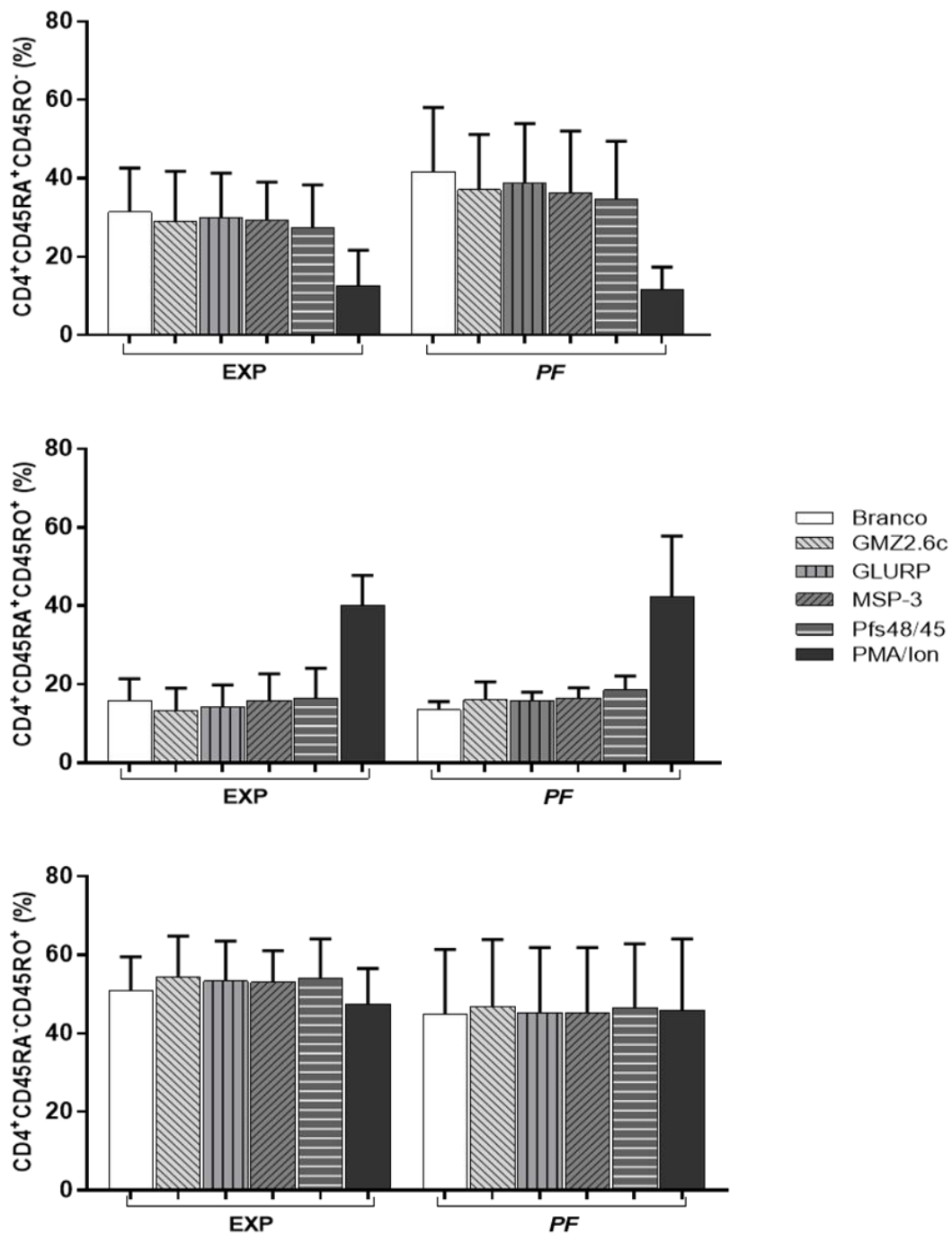
Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória foram ainda caracterizados como linfócitos T de memória central e efetora. Podemos observar um maior percentual de células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora no grupo EXP quando comparado ao percentual de células T CD4<sup>+</sup> de memória central ( $p < 0.0005$ ) enquanto nenhuma diferença significativa foi observada no grupo *PF*. Entretanto quando comparamos os dois grupos, observamos uma redução no percentual de células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora ( $p = 0.0143$ ) e aumento no percentual de células T CD4<sup>+</sup> de memória central ( $p = 0.0162$ ) no grupo *PF*. Em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, um maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória efetora quando comparado ao percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória central foi observado nos dois grupos ( $p < 0.0005$ ). No grupo *PF*, um maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória central foi observado quando comparado ao grupo EXP ( $p = 0.0287$ ) (Figura 18).



**Figura 18: Subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória central e efetora nos grupos EXP e *PF* *ex vivo*.** As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; *PF*: Grupo exposto da malária parasitado por *P. falciparum*. CD197<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>: memória central; CD197<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>: memória efetora.

**3.3.2.1.6. Caracterização funcional das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina**

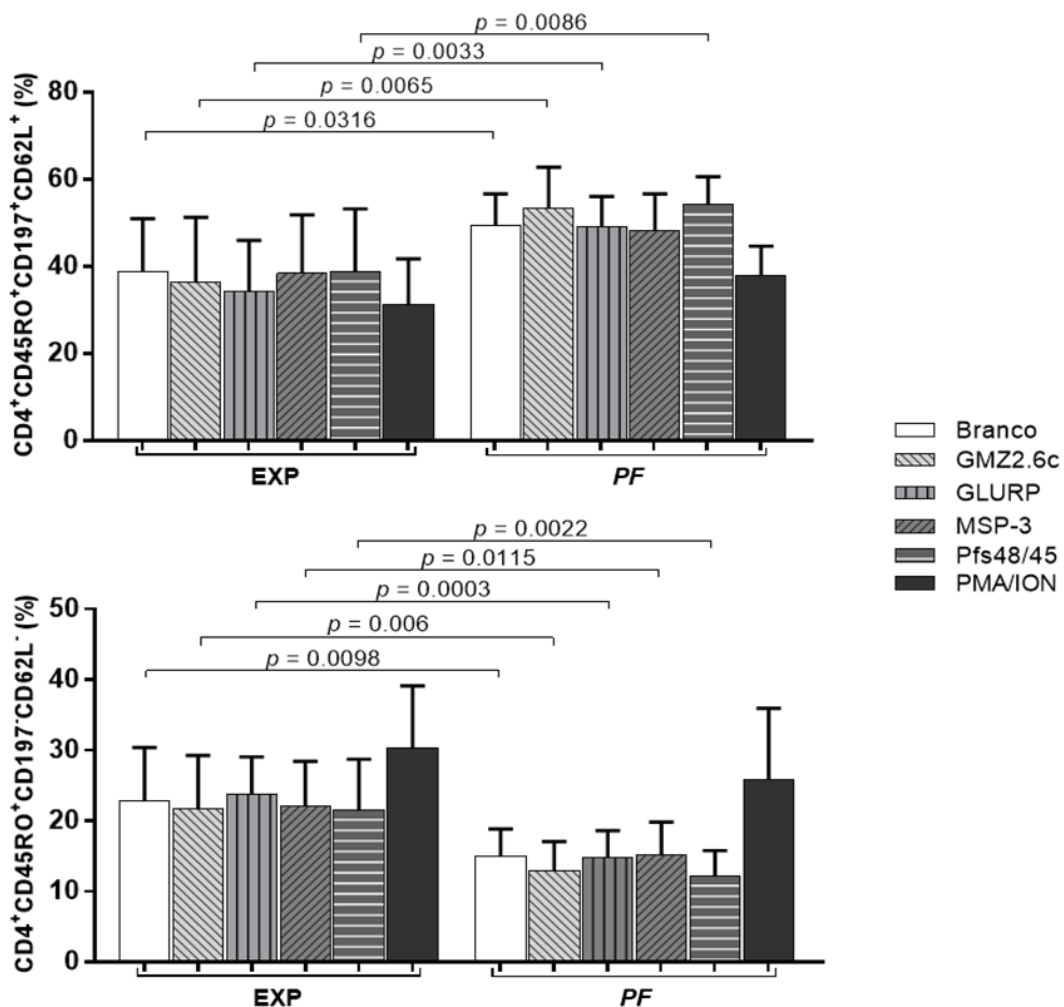
A caracterização funcional das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> também foi realizada após cultivo de 96h na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina. Não observamos diferenças significativas entre os percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naive*, em transição *naive*/memória e de memória entre os dois grupos na ausência ou presença de diferentes estímulos (Figura 19).



**Figura 19: Subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naive*, em transição *naive*/memória e de memória nos grupos EXP e PF após cultivo de 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e PMA/Ionomicina.** As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; PF: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*; Ion: Ionomicina. CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>: *naive*; CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>: Transição *naive*/memória; CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>: memória.

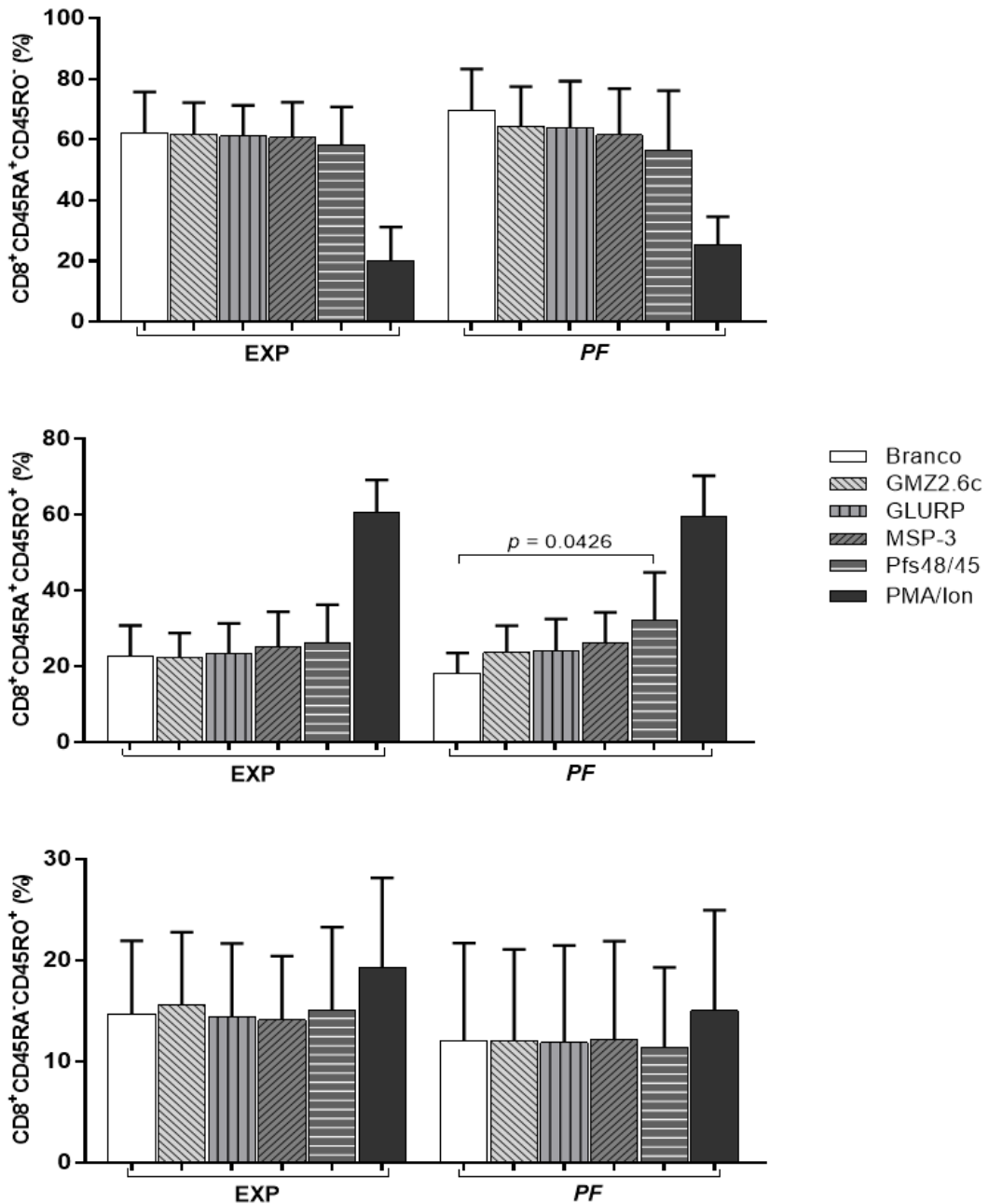


Entretanto, quando comparamos os percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória central e efetora nos dois grupos, observamos maiores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória central no grupo *PF* quando comparado ao grupo *EXP* após o cultivo na ausência ( $p = 0.0316$ ) e presença dos estímulos GMZ2.6c ( $p = 0.0065$ ), GLURP ( $p = 0.0033$ ) e *Pfs48/45* ( $p = 0.0086$ ). Além de um menor percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória efetora no grupo *PF* quando comparado ao grupo *EXP* após o cultivo na ausência ( $p = 0.0098$ ) e presença dos estímulos GMZ2.6c ( $p = 0.006$ ), GLURP ( $p = 0.0003$ ), MSP-3 ( $p = 0.0115$ ) e *Pfs48/45* ( $p = 0.0022$ ) (Figura 20).



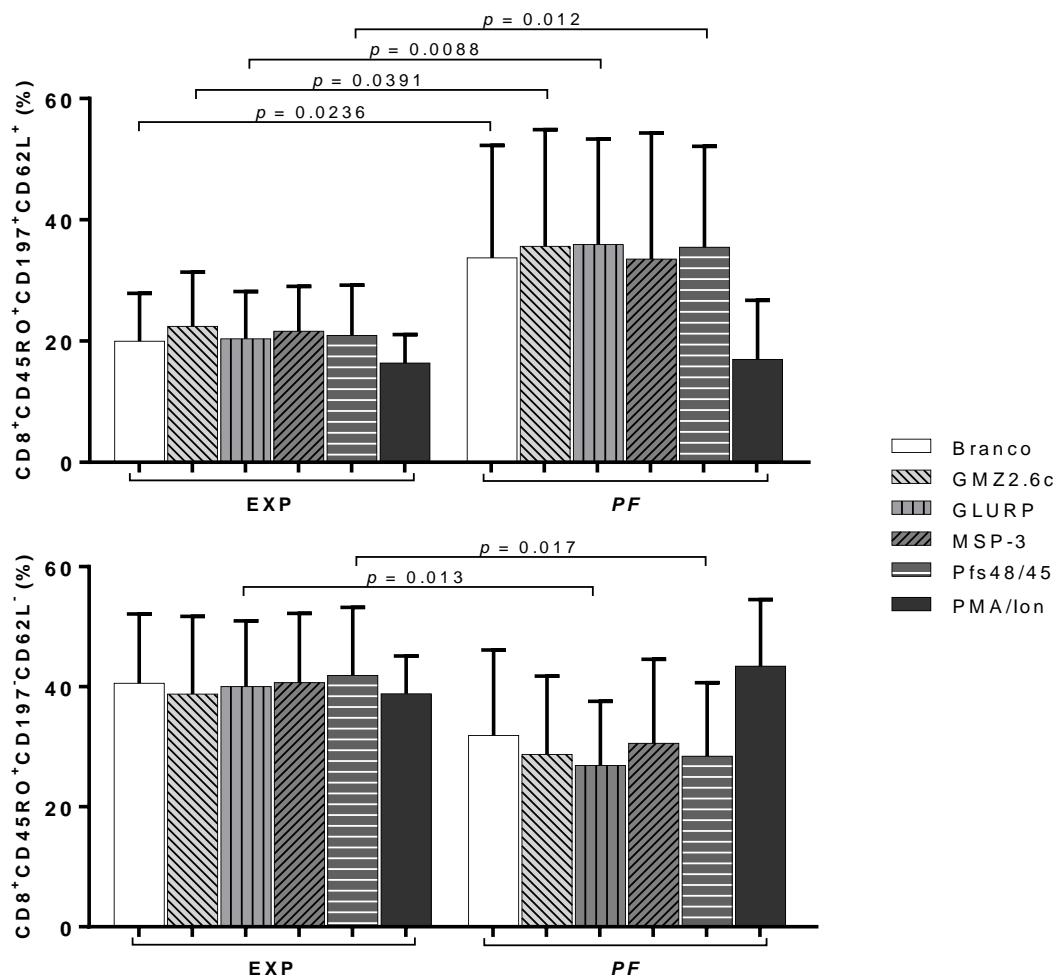
**Figura 20: Subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória central e efetora nos grupos EXP e PF após cultivo de 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, *Pfs48/45* e PMA/Ionomicina.** As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; PF: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*; Ion: Ionomicina. CD197<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>: memória central; CD197<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>: memória efetora.

Também não observamos diferenças significativas entre os percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive* e de memória entre os dois grupos na ausência ou presença de diferentes estímulos. No entanto, um maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em transição *naive*/memória após o estímulo com *Pfs48/45* quando comparado ao branco no grupo *PF* foi observado ( $p = 0.0426$ ) (Figura 21).



**Figura 21: Subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive*, em transição *naive*/memória e de memória nos grupos EXP e *PF* após cultivo de 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, *Pfs48/45* e PMA/Ionomicina.** As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; *PF*: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*; Ion: Ionomicina. CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>: *naive*; CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>: Transição *naive*/memória; CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>: memória.

Quando comparamos os percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória central e efetora nos dois grupos, observamos maiores percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória central no grupo *PF* quando comparado ao grupo *EXP* após o cultivo na ausência ( $p = 0.0236$ ) e presença dos estímulos GMZ2.6c ( $p = 0.0391$ ), GLURP ( $p = 0.0088$ ) e *Pfs48/45* ( $p = 0.012$ ). Além de um menor percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória efetora no grupo *PF* quando comparado ao grupo *EXP* após o cultivo na presença dos estímulos GLURP ( $p = 0.013$ ) e *Pfs48/45* ( $p = 0.017$ ) (Figura 22).



**Figura 22: Subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória central e efetora nos grupos EXP e PF após cultivo de 96h na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, *Pfs48/45* e PMA/Ionomicina.** As barras representam as médias e as linhas o desvio padrão. EXP: Grupo exposto a malária não parasitado; PF: Grupo exposto a malária parasitado por *P. falciparum*; Ion: Ionomicina. CD197<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>: memória central; CD197<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>: memória efetora.

### 3.3.2.2. Identificação e validação de epítomos de célula T da GMZ2.6c.

Potenciais epítomos de células T das sequências da GLURP-R0, MSP-3-C-terminal e *Pfs48/45-6c* foram identificados utilizando o Banco de Dados de Epítomos Imunes (*Immune Epitope DataBase - IEDB*), como ferramenta de análise que utiliza os algoritmos ANN aka NetMHC (163,164) para calcular a afinidade de ligação de peptídeos a diferentes alelos dos Antígenos Leucocitários Humano (*Human Leukocyte Antigen – HLA*) por meio de redes neurais artificiais e matrizes de pontuação, SMM (165) para calcular matrizes a partir de dados de afinidade quantitativos de peptídeos que se ligam a moléculas de MHC e Comblib (166) um conjunto de preditores que foram derivados de medições de afinidade de ligação de bibliotecas de peptídeos combinatórios contra um painel de alelos de MHC. Doze sequências com pontuação média consenso inferior a 20% e, pelo menos 50% da frequência de ligação ao HLA foram identificadas como potenciais epítomos de célula T (Tabela 5) e foram comercialmente sintetizadas (*GenOne Biotechnologies*) para validação pelo ensaio de ELISpot.

**Tabela 5: Peptídeos usados no ensaio de ELISpot.**

<b>Pool</b>	<b>Peptídeo</b>	<b>Sequência</b>	<b>Aminoácidos</b>
<b>MSP-3 Classe I (Mpp I)</b>	Mp 1	SSYDYILGWEF	188 - 198
<b><i>Pfs48/45</i> Classe I (Ppp I)</b>	Pp 1	KSAYMTVTI	417 - 425
	Pp 2	HTFTDSLDISL	308 - 318
	Pp3	KLFGIVGSI	394 - 402
	Pp4	GSIPKTTSF	400 - 408
<b><i>Pfs48/45</i> Classe II (Ppp II)</b>	Pp5	LEPSNIVYLD SQINIGDI	364 - 381
	Pp6	IIPDCFFQVYQPESEELE	348 - 365
<b>GLURP Classe I (Gpp I)</b>	Gp 1	KVQNHFESL	206 - 214
	Gp 2	KSNKVQNHF	203 - 211
	Gp 3	LVSENVPSGL	141 - 150
	Gp 4	KQNSQIPSL	369 - 377
	Gp 5	ETNIQEQLY	252 - 360

Os ensaios de ELISpot foram realizados utilizando o kit comercial ELISpot Plus: Human IFN- $\gamma$  (ALP) (*MabTech*) seguindo as indicações do fabricante. Brevemente, culturas celulares foram realizadas em duplicatas em placas de

nitrocelulose pré-sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti-IFN- $\gamma$  (Clone D1K). As placas foram bloqueadas com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB por 30 minutos e lavadas quatro vezes com PBS 1X. As células ( $2,5 \times 10^5$ /poço) foram adicionadas nas placas na presença de meio sem estímulo, 10 $\mu$ g/ml de cada pool de peptídeos ou anticorpo monoclonal CD3-2 como controle positivo. As células foram estimuladas por 24 horas à 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a estimulação, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS 1X e incubadas com 1 $\mu$ g/ml de anticorpo biotilado anti-IFN- $\gamma$  humano (Clone 7-B6-1) diluído em PBS 1X contendo 0.5% de SFB por 1 hora e 30 minutos à 37°C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS 1X e incubadas com Estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina diluída (1:1000) em PBS 1X contendo 0.5% SFB por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas quatro vezes e reveladas com 1-step NBT/BCIP. A reação foi parada pela lavagem da membrana com água destilada. Os *Spots* formados pelas células secretoras de IFN- $\gamma$  foi contado com o *Immunospot reader (Cellular Technology Ltd)* usando o *Immunospot Software*. Os resultados obtidos no ensaio de ELISpot foram expressos como células formadoras de *spot (Spot-forming cells – SFC)* por 250.000 células. Indivíduos foram considerados respondedores quando a média do número de spot dos poços com estímulo diminuído da média do número de spot dos poços sem estímulo foi maior do que 20 SFC/ $2,5 \times 10^5$  células. Os dados foram armazenados no bando de dados Epi-Info 6 (*Centers for Disease Control and Prevention*) e analisados no GraphPadPrism (*GraphPad Software, Inc*). A diferença entre as frequências de respondedores foi avaliada pelo teste qui-quadrado e o teste *T de Student* foi usado para comparar as médias de SFC/ $2,5 \times 10^5$  células de cada *pool* de peptídeos. As associações entre os dados clínicos e epidemiológicos e indivíduos respondedores e não respondedores foram realizadas utilizando o teste de *Mann-Whitney*.

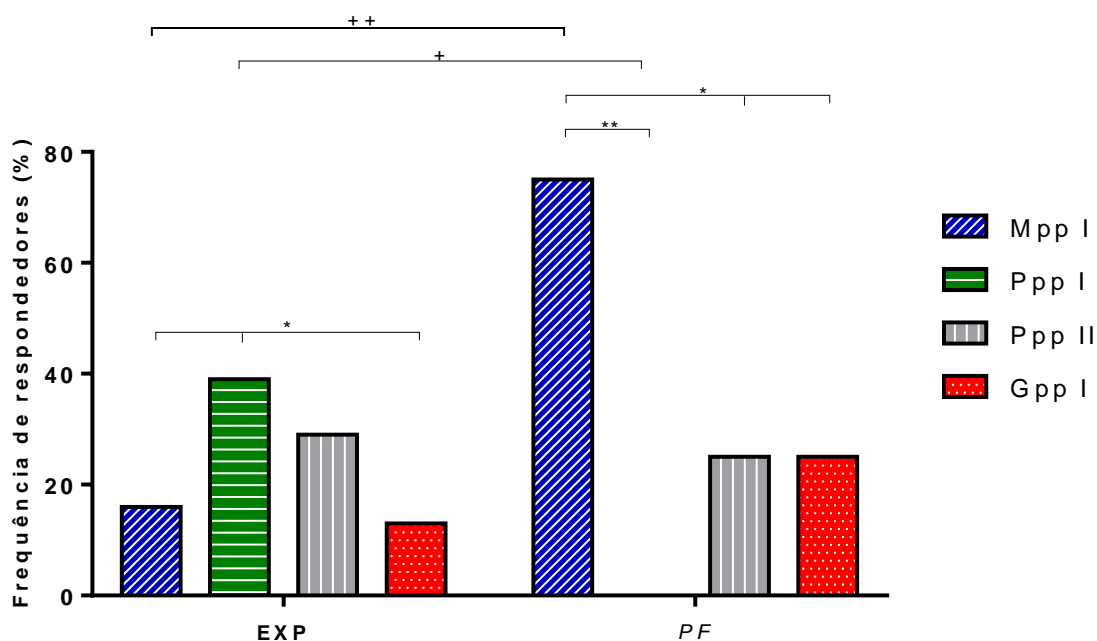
Células de 31 indivíduos expostos a infecção não parasitados (Grupo EXP) e 8 indivíduos parasitados por *P. falciparum* (Grupo PF) foram utilizadas nos ensaios de ELISpot. Não observamos quaisquer diferenças em relação a gênero, idade, tempo de residência em área endêmica e tempo decorrido desde a última infecção de malária, entretanto, indivíduos do grupo EXP apresentaram um menor número de infecções anteriores de malária que o grupo PF ( $p = 0.0389$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6: Características pessoais e epidemiológicas dos grupos EXP e PF para o mapeamento de epítomos de células T da GMZ2.6c.**

		EXP (n=31)	PF (n=8)
<b>Dados pessoais</b>			
Gênero	Masculino	14 (45.2%)	4 (50%)
	Feminino	17 (54.8%)	4 (50%)
Idade		35.5 ± 13.7	36.3 ± 11.2
Tempo de residência em área endêmica de malária (anos)		34.9 ± 13.4	28.7 ± 16.2
<b>Dados clínicos e epidemiológicos</b>			
Número de episódios anteriores de malária		7.9 ± 7.5*	15.3 ± 9.3
Tempo decorrido desde o último episódio de malária (meses)		51 ± 84	12.2 ± 10.5

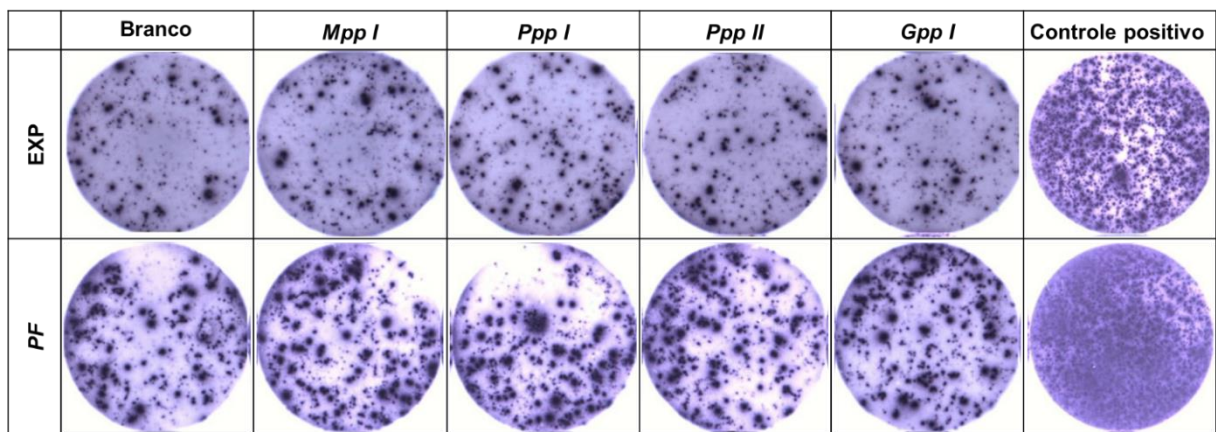
$p = 0.0389$  EXP versus PF.

As frequências de indivíduos respondedores para os *pools* Mpp I, Ppp I, Ppp II e Gpp I foram, respectivamente: 16.1% (5/31), 38.7% (12/31), 29% (9/31) e 12.9% (4/31) no grupo EXP e; 75% (6/8), 0% (0/8), 25% (2/8) e 25% (2/8) no grupo PF (Figura 23).



**Figura 23: Frequência de indivíduos respondedores para os *pools* de peptídeos Mpp I, Ppp I, Ppp II e Gpp I nos grupos EXP e PF.** Diferenças estatísticas de respondedores de diferentes *pools* de peptídeos no mesmo grupo estão representadas por \* e diferenças estatísticas de respondedores do mesmo *pool* de peptídeos em grupos diferentes estão representadas por +. (\*; +)  $P < 0.05$ ; (\*\*; ++)  $P < 0.005$ .

Indivíduos do grupo EXP apresentaram uma maior frequência de resposta para o *pool* Ppp I quando comparados aos *pools* Mpp I ( $p = 0.04$ ) e Gpp I ( $p = 0.02$ ), enquanto no grupo PF, uma maior frequência de respondedores para o *pool* Mpp I ( $p = 0.001$  para Ppp I;  $p = 0.04$  para Ppp II e Gpp I) foi observada. Quando comparamos os grupos EXP e PF, verificamos que indivíduos parasitados por *P. falciparum* apresentaram uma maior frequência de resposta contra o *pool* Mpp I ( $p = 0.001$ ) e menor frequência de resposta contra o *pool* Ppp I ( $p = 0.03$ ). Nenhuma diferença foi observada nos números de SFC/ $2,5 \times 10^5$  células entre os indivíduos respondedores para cada *pool* de peptídeos (Grupo EXP: Mpp I =  $26.9 \pm 6.4$ ; Ppp I =  $40.1 \pm 20.3$ ; Ppp II =  $39.5 \pm 29.8$ ; Gpp I =  $45.5 \pm 20.6$ ; Grupo PF: Mpp I =  $41.3 \pm 32.1$ ; Ppp II =  $23 \pm 3.5$ ; Gpp I =  $34.2 \pm 7.4$ ) (Figura 24). Curiosamente, indivíduos do grupo EXP respondedores para os *pools* Mpp I e Gpp I possuíam maior tempo desde a última infecção de malária que os indivíduos não respondedores (Mpp I: 84 e 17; Gpp I: 72 e 20.5, medianas para respondedores e não respondedores, respectivamente).



**Figura 24:** Imagens representativas dos poços das placas de ELISpot mostrando a produção de IFN- $\gamma$  após estimulação com os *pools* de peptídeos Mpp I, Ppp I, Ppp II e Gpp I, além dos poços não estimulados (Branco) e controle positivo (Anti-CD3). O número de spots representa o número de células T produtoras de IFN- $\gamma$ .

### 3.3.3. Avaliação da diversidade dos genes que codificam as proteínas *PfGLURP*, *PfMSP-3* e *Pfs48/45* e seu impacto nos epítomos de células B e T.

Amostras de 67 indivíduos parasitados por *P. falciparum* foram utilizadas para a avaliação da diversidade dos genes que codificam as proteínas *PfGLURP*, *PfMSP-3* e *Pfs48/45*.

O DNA foi extraído das amostras de sangue utilizando o Kit *QIAmp® DNA Blood MiniKit* (*QIAGEN*), de acordo com as instruções do fabricante e estocado à -20°C até o momento do uso. Os segmentos gênicos correspondentes à *GLURP*<sub>79-1500</sub> e *MSP-3*<sub>463-747</sub> foram amplificados através da técnica de *Nested* Reação em Cadeira da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), enquanto os segmentos gênicos correspondentes à *Pfs48/45*<sub>859-1284</sub> foram amplificados através da técnica de *Semi-Nested* PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 7) previamente descritos (133,148,167,168).

**Tabela 7: Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes *PfGLURP*, *PfMSP-3* e *Pfs48/45*.**

Gene	Iniciadores	Sequência dos iniciadores
<b><i>PfGLURP</i></b>	Senso (DA153)	5' -ATGAGAAACCTTTTCCATAT- 3'
	Anti-senso (PF55)	5' -TGCTTCATGCTCGCTTTTTTCCGAT- 3'
	Senso (PF61)	5' -TACAAGTGAGAATAGAAATAAAC- 3'
	Anti-senso (PF62)	5' -CACAGTTTCTTCATGTTTCGACAGT- 3'
<b><i>PfMSP-3</i></b>	Senso (M3F/O)	5' -ATGAAAAGTTTTATAAATATTACTCTTC- 3'
	Anti-senso (M3R/I)	5' -AATGATTTTTAAAATATTTGGATAATTC- 3'
	Senso (DA151.2)	5' -CATGAAAGGGCAAAAATGCTTA- 3'
	Anti-senso (DA152.2)	5' -CATTTTCCTTAGATATATTTTCC- 3'
<b><i>Pfs48/45</i></b>	Senso (F533)	5' -AGTGCTATGGTACATGTACG- 3'
	Senso (F600)	5' -TCATGAGCTAAATATATAATAATATTGC- 3'
	Anti-senso (R1327)	5' -CAAATGATCTTTTTACATATTTGCC- 3'

Fonte: Pratt-Riccio et al., 2013 (133); Pattaradilokrat S et al., 2016 (148); Anthony TG et al., 2007 (167); Roussilhon C et al., 2007 (168).



As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 2µL de DNA genômico dos isolados plasmodiais ou produto da primeira reação, 2,5µL de tampão 10X, 1.5mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0.2mM de cada DNTP, 0.5µM de cada iniciador (*GenOne Biotechnologies*) e 2.5U de AmpliTaq Gold™ DNA Polimerase (*Applied Biosystems*) para todos os genes. As reações foram submetidas a ciclagens de temperaturas específicas (Tabela 8) para cada par de primer nos termocicladores PCR-T100 (*Bio-Rad*), ProFlex PCR System® (*Applied Biosystems*) ou GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*). Em todas as reações foram utilizados um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo (DNA extraído de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, cepa W2).

Ao final da reação, 15µL do produto de PCR em 3µL de tampão de amostra (6X Loading Dye, *Thermo Fisher Scientific*) foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% (*Sigma-Aldrich*) em tampão TAE 1X (0.04M Tris-acetato, 0.001M EDTA, *Sigma-Aldrich*) contendo 0.3µg/mL de Brometo de Etídio (*Sigma-Aldrich*), a uma corrente constante de 95 V/cm durante aproximadamente 45 minutos. Para a estimativa do peso molecular dos fragmentos amplificados foram utilizados os marcadores de peso molecular de 1kb e 100 pb (*Thermo Fisher Scientific*). Os fragmentos foram visualizados utilizando o transiluminador *High Performace UV transilluminator (UVP)*.

**Tabela 8: Condições de ciclagem para amplificação dos genes *PfGLURP*, *PfMSP-3* e *Pfs48/45*.**

			35 ciclos para <i>PfGLURP</i> e <i>PfMSP-3</i> e 45 ciclos para <i>Pfs48/45</i>			
<b><i>PfGLURP</i></b>	1ª Reação (DA153/PF55)	94°C - 10'	94°C - 01'	48°C - 01'	72°C - 2'	72°C - 5'
	2ª Reação (PF61/PF62)	94°C - 10'	94°C - 01'	55°C - 01'	72°C - 2'	72°C - 5'
<b><i>PfMSP-3</i></b>	1ª Reação (M3F/O/M3R/I)	94°C - 10'	95°C - 45''	57°C - 45''	72°C - 1' 20''	72°C - 10'
	2ª Reação (DA151.2/DA152.2)	94°C - 10'	94°C - 1'	53°C - 1'	72°C - 2'	72°C - 10'
<b><i>Pfs48/45</i></b>	1ª Reação (F533/R1327)	94°C - 10'	94°C - 01'	52°C - 01'	72°C - 1'	72°C - 10'
	2ª Reação (F600/R1327)	94°C - 10'	95°C - 01'	58°C - 01'	72°C - 2'	72°C - 10'

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo as indicações do fabricante. Após a purificação foi realizada a quantificação do DNA, utilizando o fluorômetro Qubit (*Invitrogen*). Para determinação das sequências exatas dos nucleotídeos, todas as amostras amplificadas foram então submetidas a reação de sequenciamento proposto por Sanger et al. (1977) utilizando o kit de sequenciamento *Big Dye Terminator Cycle Ready Reaction* versão 3.1 (*Applied Biosystems*) em condições previamente padronizadas pela Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/Fiocruz).

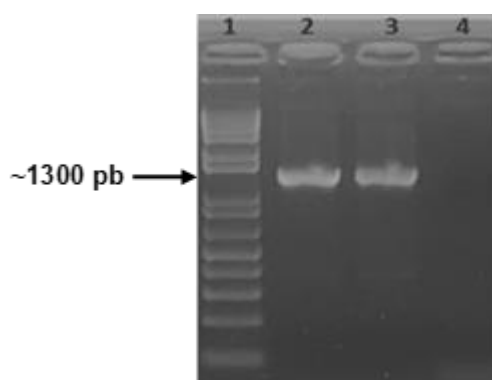
As sequências nucleotídicas obtidas de cada amostra foram analisadas utilizando os programas provenientes do pacote DNASTAR (Lasergene Software). O programa BLAST (Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas - NCBI) foi utilizado para verificar a similaridade e identificar os polimorfismos em relação a sequência referência 3D7 depositada no NCBI. O alinhamento da sequência consenso com a sequência referência foi realizado pelo programa MegAlign 7.0.0 (DNASTAR/Lasergene Software) utilizando o algoritmo do programa Clustal X2 e Clustal Ômega sendo feito um ajuste manual através do programa EditSeq 7.0.0 (DNASTAR/Lasergene Software). A fim de estimar a diversidade genética intrapopulacional, as sequências gênicas que codificam *PfGLURP*, *PMSP-3* e *Pfs48/45* foram analisadas utilizando o software DnaSP v6 (169) com base nos parâmetros de número de sítios segregantes (S), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), número médio de diferenças nucleotídicas (k), número de haplótipos (h) e diversidade haplotípica (Hd). Para testar a teoria neutra da evolução, os valores D de Tajima foram calculados utilizando o número total de mutações também estimadas com o software DnaSP v6. O teste Tajima prediz as forças de seleção e demográficas que atuam sobre uma população. Valores positivos podem ser sugestivos de seleção positiva ou balanceadora. Essa força mantém os alelos em frequências equilibradas. Por outro lado, valores negativos sugerem seleção purificadora ou expansão populacional recente (170).

A estrutura 3D da proteína GMZ2.6c foi predita utilizando o servidor *Robetta* (171). O servidor *Robetta* permite a modelagem de estruturas 3D de proteínas através de abordagens *ab initio* e por comparação. Esse servidor é continuamente

avaliado pelo CAMEO (Modelo de Avaliação Automatizada Continuada) e estabelece critérios de avaliação de qualidade de previsão da estrutura proteica (171,172). A qualidade das estruturas proteicas geradas foi analisada pelo sistema MolProbity, amplamente utilizado para validação de proteínas e ácidos nucleicos, a fim de escolher o melhor modelo preditivo das proteínas de interesse (173).

### 3.3.3.1. Amplificação dos segmentos gênicos de *PfGLURP*<sub>79-1500</sub>, *PfMSP-3*<sub>463-747</sub> e *Pfs48/45*<sub>859-1284</sub>

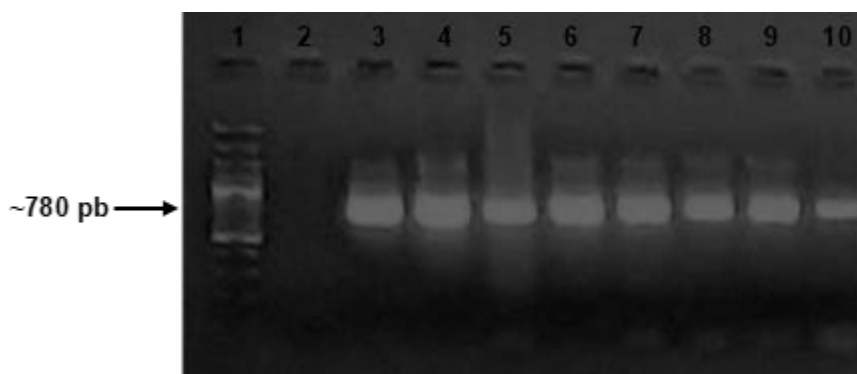
Para avaliar o perfil polimórfico das regiões gênicas que codificam as proteínas *PfGLURP*, *PfMSP-3* e *Pfs48/45* foram utilizados 67 isolados coletados nos municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará com diagnóstico positivo para *P. falciparum* por microscopia e confirmado por PCR. Um total de 42, 28 e 50 isolados foram amplificados para *PfGLURP*, *PfMSP-3* e *Pfs48/45*, respectivamente. Todos os isolados apresentaram apenas um fragmento de aproximadamente 1300 pb para a *PfGLURP*, 200 pb para a *PfMSP-3* e 780 pb para a *Pfs48/45* (Figura 25, 26 e 27). As amostras amplificadas foram purificadas, quantificadas e submetidas a reação de sequenciamento.



**Figura 25: Amplificação por PCR da região R0 do gene *PfGLURP*.** Gel de agarose (2%) mostrando o tamanho do fragmento dos produtos de PCR de aproximadamente 1300 pb. Linha 1: Marcador de peso molecular de 1kb; Linha 2: Isolado de *P. falciparum* proveniente de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará; Linha 3: Controle positivo (DNA extraído de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*); 4: Controle negativo (sem DNA).



**Figura 26: Amplificação por PCR da região C-terminal do gene *PfMSP-3*.** Gel de agarose (2%) mostrando o tamanho do fragmento dos produtos de PCR de aproximadamente 200 pb. Linha 1: Marcador de peso molecular de 1kb; Linhas 2 a 13: Isolados de *P. falciparum* provenientes de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará; Linha 14: Controle positivo (DNA extraído de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*); 15: Controle negativo (sem DNA).



**Figura 27: Amplificação por PCR da região 6c do gene *Pfs48/45*.** Gel de agarose (2%) mostrando o tamanho do fragmento dos produtos de PCR de aproximadamente 780 pb. Linha 1: Marcador de peso molecular de 1kb; Linha 2: Controle negativo (sem DNA); Linha 3: Controle positivo (DNA extraído de cultivo *in vitro* de *P. falciparum*); Linhas 4 a 10: Isolados de *P. falciparum* provenientes de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará.

### 3.3.3.2. Análise do polimorfismo genético da *PfGLURP*

Todos os 42 (23 de Cruzeiro do Sul, 14 de Mâncio Lima e 5 de Guajará) isolados amplificados para *PfGLURP* foram sequenciados e apresentaram cerca de 99% de similaridade com a cepa referência *PF3D7* (PF3D7\_1035300). Entretanto, em nossas análises, foram encontrados 33 polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs), sendo dois (6%) SNPs sinônimos (*Synonyms Single Nucleotide Polymorphisms* - sSNPs) nas posições T591A e A1557G e 31 (94%) SNPs não sinônimos (*Non-Synonyms Single Nucleotide Polymorphisms* - nsSNP) nas posições: G263C, T264C, A268G, G272C, A277T, A279C, T284C, G290T, T299C, A373C, G430A, T444G, T580A, T599A, T620G, C622G, A642C, T667C, A750T, A805G, A850G, G925C, G926A, A940C, C1012T, A1067G, G1207A,

T1308G, A1553T, T1554G e A1556T (Tabela 9). Com exceção dos SNPs nas posições T264C, A279C, G430A, A750T, T1308G e A1557G, os demais ocorreram em pelo menos 2 isolados. Além disso, foi possível observar que 4 polimorfismos apresentaram 2 SNPs no mesmo códon (G263C\_T264C, A277T\_A279C, G925C\_G926A e A1553T\_T1554G). Os nsSNP A373C e T599A foram os mais frequentes, presentes em 42 (100%) isolados, enquanto o nsSNP A850G está presente em 41 (97.6%) isolados. Apenas dois SNPs sinônimos foram encontrados, T591A e A1557G, presentes em 26 (61.9 %) e 1 (2,4 %) dos isolados, respectivamente. Em relação as áreas endêmicas estudadas, 25 (G263C, A268G, G272C, A277T, T284C, T299C, A373C, G430A, T444G, T580A, T591A, T599A, T620G, C622G, A642C, T667C, A805G, A850G, G925C\_G926A, A940C, C1012T, A1067G, T1308G, T1554G e A1556T), 22 (A268G, A373C, T580A, T591A, T599A, T620G, C622G, A642C, T667C, A750T, A805G, A850G, G925C\_G926A, A940C, C1012T, A1067G, G1207A, A1553T, T1554G, A1553T\_T1554G, A1556T e A1557G) e 20 (G263C\_T264C, A268G, G272C, A277T\_A279C, T284C, G290T, T299C, A373C, T444G, T580A, T591A, T599A, T620G, C622G, A642C, A805G, G925C\_G926A, A940C, C1012T e A1067G) polimorfismos foram encontrados em isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará, respectivamente.

**Tabela 9: Polimorfismos encontrados no gene que codifica a região R0 da *PfGLURP*: posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos.**

<b><i>PfGLURP</i></b>				
Localização		Códon Selvagem	Códon Mutado	Frequência ( <i>n</i> =42)
Posição no Gene	AA			
G263C	S88T	AGT	<u>A</u> CT	2 (4.7%)
G263C_T264C	S88T	AGT	<u>A</u> CC	1 (2.4%)
A268G	N90D	AAT	<u>G</u> AT	9 (21.4%)
G272C	R91T	AGA	<u>A</u> CA	3 (7.1%)
A277T	K93*	AAA	<u>T</u> AA	3 (7.1%)
A277T_A279C	K93Y	AAA	<u>T</u> AC	1 (2.4%)
T284C	I95T	ATC	<u>A</u> CC	2 (4.7%)
G290T	G97T	GGT	<u>G</u> TT	2 (4.7%)
T299C	L100S	TTA	<u>T</u> CA	2 (4.7%)
A373C	K125Q	AAA	<u>C</u> AA	42 (100%)
G430A	E144K	GAA	<u>A</u> AA	1 (2.4%)
T444G	S148R	AGT	<u>A</u> GG	2 (4.7%)
T580A	S194T	TCT	<u>A</u> CT	26 (61.9%)
T591A	I197I	ATT	<u>A</u> TA	26 (61.9%)
T599A	V200E	GTA	<u>G</u> AA	42 (100%)
T620G	V207G	GTA	<u>G</u> GA	26 (61.9%)
C622G	Q208E	CAA	<u>G</u> AA	26 (61.9%)
A642C	L214F	TTA	<u>T</u> TC	26 (61.9%)
T667C	S223P	TCC	<u>C</u> CC	26 (61.9%)
A750T	L250F	TTA	<u>T</u> TT	1 (2.4%)
A805G	K269E	AAA	<u>G</u> AA	30 (71.4%)
A850G	K284E	AAG	<u>G</u> AG	41 (97.6%)
G925C_G926A	G309Q	GGA	<u>C</u> AA	31 (73.8%)
A940C	K314Q	AAA	<u>C</u> AA	31 (73.8%)
C1012T	P338S	CCA	<u>T</u> CA	13 (30.9%)
A1067G	Q356R	CAG	<u>C</u> GG	6 (14.3%)
G1207A	E403K	GAA	<u>A</u> AA	2 (4.7%)
T1308G	N436K	AAT	<u>A</u> AG	1 (2.4%)
A1553T	H518L	CAT	<u>C</u> TT	1 (2.4%)
T1554G	H518Q	CAT	<u>C</u> AG	2 (4.7%)
A1553T_T1554G	H518L	CAT	<u>C</u> TG	1 (2.4%)
A1556T	E519V	GAA	<u>G</u> TA	3 (7.1%)
A1557G	E519E	GAA	<u>G</u> AG	1 (2.4%)

AA: Aminoácido; *n*: Número; S: Serina; T: Treonina; N: Asparagina; D: Ácido Aspártico; R: Arginina; K: Lisina; I: Isoleucina; G: Glicina; V: Valina; L: Leucina; Q: Glutamina; Y: Tirosina; E: Ácido Glutâmico; F: Fenilalanina; P: Prolina; A: Alanina; H: Histidina; C: Cisteína; \*: Códon de parada.

### 3.3.3.3. Análise do polimorfismo genético da *PfMSP-3*

Todos os 28 (13 de Cruzeiro do Sul, 9 de Mâncio Lima e 6 de Guajará) isolados amplificados para a *PfMSP-3* foram sequenciados e apresentaram cerca de 99% de similaridade com a cepa referência *PF3D7* (PF3D7\_1035400). Entretanto, em nossas análises, foram encontrados 3 nsSNPs nas posições: T499C, A500C e A506G (Tabela 10). Com exceção do nsSNP na posição A500C, os demais ocorreram em todos os isolados amplificados. O nsSNP A500C estava presente em somente 9/28 (32.1%) isolados e em conjunto com o nsSNP T499C. Todos os polimorfismos foram encontrados nas três localidades, no entanto, o nsSNP A500C foi encontrado em 2/13 (15.4%), 4/9 (44.4%) e 3/6 (50%) dos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará, respectivamente.

**Tabela 10: Polimorfismos encontrados no gene que codifica a região C-terminal da *PfMSP-3*: posições dos nucleotídeos e respectivas substituições de aminoácidos.**

<i>PfMSP-3</i>				
Localização		Códon Selvagem	Códon Mutado	Frequência ( <i>n</i> =28)
Posição no Gene	AA			
T499C	Y167H	TAT	<u>C</u> AT	28 (100%)
T499C_A500C	Y167P	TAT	<u>C</u> CT	9 (32.14%)
A506G	K169R	AAG	<u>A</u> GG	28 (100%)

AA: Aminoácido; *n*: Número; R: Arginina; K: Lisina; P: Prolina; H: Histidina.

### 3.3.3.4. Análise do polimorfismo genético da *Pfs48/45*

De 50 amostras amplificadas para a *Pfs48/45*, 45 foram sequências e apresentaram 100% de similaridade com a sequência referência *PF3D7* (PF3D7\_1346700), não apresentando nenhum SNP na região genética que codifica o domínio III da *Pfs48/45*.

### **3.3.3.5. Diversidade genética encontrada na população estudada**

A análise das sequências obtidas demonstrou que nenhum isolado manteve sua sequência idêntica a cepa referência 3D7 para a *PfGLURP*. Considerando a sequência referência como variante selvagem (VS), os SNPs observados nos isolados resultaram em 25 variantes (Tabela 11). Dentro dos isolados estudados, a variante V10g (Variante 10 do gene *PfGLURP*) foi a mais frequente (28.57%), seguida da V13g (14.28%), enquanto as variantes V1g, V2g, V3g, V4g, V5g, V6g, V7g, V8g, V9g, V11g, V12g, V14g, V15g, V16g, V17g, V18g, V19g, V20g, V21g, V22g, V23g, V24g e V25g apresentaram menor frequência. É possível observar que as variantes V10g e V13g estão presentes nas 3 localidades, enquanto as outras estão presentes em somente 1 município (V1g, V2g, V4g, V5g, V6g, V7g, V8g, V18g, V19g, V21g, V24g e V25g em Cruzeiro do Sul; V9g, V11g, V12g, V14g, V16g, V17g, V22g e V23g em Mâncio Lima; V3g, V15g e V20g em Guajará). Os alinhamentos podem ser conferidos no Anexo VI.



**Tabela 11: Variantes da PfGLURP e suas frequências na população estudada.**

<b>Variantes</b>	<b>Sequências</b>	<b>Cruzeiro do Sul (n = 23)</b>	<b>Mâncio Lima (n = 14)</b>	<b>Guajará (n = 5)</b>	<b>Total (n = 42)</b>
<b>VS</b>	GTAGAATGTAGTTTTTCATAAAGGACAGTATAA	0/23 (0%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	0/42 (0%)
<b>V1g</b>	CTAGTATTCCGTAAAGGCCAGGCACCAGTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V2g</b>	CTACAATGTCGTTTATCATAAGGGATAGTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V3g</b>	CCGCTCCTCCGTAAAGGCCAGGCACCAGTATAA	0/23 (0%)	0/14 (0%)	1/5 (20%)	1/42 (2.38%)
<b>V4g</b>	GTAGAATGTCGTTTATCATAAGGGCCAGTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V5g</b>	GTACTACGTCGTAAAGGCCAGGCACCAGTTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V6g</b>	GTAGAATGTCATAAAGGCCAGGCACCAGTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V7g</b>	GTAGAATGTCGGTTATCATAAGGGATAGTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V8g</b>	GTGGAATGTCGTAAAGGCCAGGCACCAGTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V9g</b>	GTAGAATGTCGTAAAGGCCTGGCACCAGTATAA	0/23 (0%)	1/14 (7.14%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V10g</b>	GTAGAATGTCGTAAAGGCCAGGCACCAGTATAA	6/23 (26.1%)	5/14 (35.7%)	1/5 (20%)	12/42 (28.57%)
<b>V11g</b>	GTAGAATGTCGTTTATCATAGACACAGTATAA	0/23 (0%)	1/14 (7.14%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V12g</b>	GTAGAATGTCGTTTATCATAAGCACCAGTATAA	0/23 (0%)	1/14 (7.14%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V13g</b>	GTAGAATGTCGTTTATCATAAGGGATAGTATAA	4/23 (17.39%)	1/14 (7.14%)	1/5 (20%)	6/42 (14.28%)
<b>V14g</b>	GTGGAATGTCGTTTATCATAAGGGATGGTATAA	0/23 (0%)	1/14 (7.14%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V15g</b>	GTGGAATGTCGTTTATCATAAGGGATAGTATAA	0/23 (0%)	0/14 (0%)	1/5 (20%)	1/42 (2.38%)
<b>V16g</b>	GTGGAATGTCGTAAAGGCCAGGCACCGATATAA	0/23 (0%)	1/14 (7.14%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V17g</b>	GTAGAATGTCGTTTATCATAAGGGATAGTATAG	0/23 (0%)	1/14 (7.14%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)

Tabela 11: (Continuação) Variantes da *Pf*GLURP e suas frequências na população estudada.

<b>Variantes</b>	<b>Sequências</b>	<b>Cruzeiro do Sul (n = 23)</b>	<b>Mâncio Lima (n = 14)</b>	<b>Guajará (n = 5)</b>	<b>Total (n = 42)</b>
<b>V18g</b>	GTAGAATGTCGTAAAGGCCAGGCACCGGTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V19g</b>	GTAGAATGTCGTTTATCATAAGGGATGGTATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V20g</b>	GTAGAATGTCGGAAAGGCCAGGCACCGGTATAA	0/23 (0%)	0/14 (0%)	1/5 (20%)	1/42 (2.38%)
<b>V21g</b>	GTGGAATGTCGTAAAGGCCAGGCACAGGATAA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V22g</b>	GTGGAATGTCGTAAAGGCCAGGCACCGATTTTA	0/23 (0%)	1/14 (7.14%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V23g</b>	GTGGAATGTCGTAAAGGCCAGGCACCGATTGTA	0/23 (0%)	1/14 (7.14%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)
<b>V24g</b>	GTAGAATGTCGTAAAGGCCAGGCACAGTAGAA	2/23 (8.7%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	2/42 (4.76%)
<b>V25g</b>	GTGGAATGTCGTTTATCATAAGGGATAGTATTA	1/23 (4.34%)	0/14 (0%)	0/5 (0%)	1/42 (2.38%)

VS: Variante selvagem; n: Número; Vng: Variante n da *Pf*Glurp.

A análise das sequências obtidas demonstrou que nenhum isolado manteve sua sequência idêntica a cepa 3D7 para a *PfMSP-3*. Considerando a sequência referência como variante selvagem (VS), os SNPs observados nos isolados resultaram em apenas 2 variantes (Tabela 12), identificadas nas 3 localidades. As variantes V1m e V2m estavam presentes em 67.9% e 32.1% dos isolados estudados, respectivamente. Em cruzeiro do Sul, uma maior frequência da variante V1m foi encontrada (84.6%), enquanto nas outras localidades a distribuição das variantes foi bem homogênea (Mâncio Lima - V1m: 55.6%; V2m: 44.4%; Guajará – V1m: 50%; V2m: 50%). Os alinhamentos podem ser conferidos no Anexo VI.

**Tabela 12: Variantes da *PfMSP-3* encontradas e suas frequências na população estudada.**

<b>Variantes</b>	<b>Sequências</b>	<b>Cruzeiro do Sul (n = 13)</b>	<b>Mâncio Lima (n = 9)</b>	<b>Guajará (n = 6)</b>	<b>Total (n = 28)</b>
<b>VS</b>	TAA	0/14 (0%)	0/9 (0%)	0/6 (0%)	0/28 (0%)
<b>V1m</b>	<b>CAG</b>	11/13 (84.6%)	5/9 (55.6%)	3/6 (50%)	19/28 (67.9%)
<b>V2m</b>	<b>CCG</b>	2/13 (15.4%)	4/9 (44.4%)	3/6 (50%)	9/28 (32.1%)

VS: Variante selvagem; n: Número; Vnm: Variante n da *PfMSP-3*.

### **3.3.3.6. Análise genética intrapopulacional**

A análise genética intrapopulacional da *PfGLURP* mostrou maior diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) em Guajará ( $0.00862 \pm 0.00195$ ) quando comparada a Cruzeiro do Sul ( $0.00547 \pm 0.00052$ ) e Mâncio Lima ( $0.00546 \pm 0.00087$ ). A diversidade de haplótipos ( $H_d$ ) também foi maior em Guajará ( $1.000 \pm 0.126$ ) quando comparada a Cruzeiro do Sul ( $0.913 \pm 0.043$ ) e Mâncio Lima ( $0.890 \pm 0.081$ ). Para avaliar se há pressão seletiva no gene da *PfGLURP* foi realizado o teste D de Tajima. Os valores foram positivos entre 0.34747 (Cruzeiro do Sul), 0.53829 (Mâncio Lima) e 0.44941 (Guajará), e não se mostraram significativos, sugerindo que não há seleção significativa na região gênica que codifica o domínio R0 da *PfGLURP* (Tabela 13).

**Tabela 13: Diversidade genética intrapopulacional do gene *PfGLURP* em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará.**

<i>Parâmetros</i>	<i>Cruzeiro do Sul (n = 23)</i>	<i>Mâncio Lima (n = 14)</i>	<i>Guajará (n = 5)</i>	<i>Total (n = 42)</i>
<i>Nº de Sítios Segregantes (S)</i>	24	20	22	31
<i>Diversidade nucleotídica (<math>\pi</math>) <math>\pm</math> DP</i>	0.00547 $\pm$ 0.00052	0.00546 $\pm$ 0.00087	0.00862 $\pm$ 0.00195	0.00565 $\pm$ 0.00046
<i>Número médio de diferenças nucleotídicas (k)</i>	7.10672	7.09890	11.20000	7.33914
<i>Nº de haplótipos (h)</i>	14	10	5	25
<i>Diversidade haplotípica (Hd) <math>\pm</math> DP</i>	0.913 $\pm$ 0.043	0.890 $\pm$ 0.081	1.000 $\pm$ 0.126	0.905 $\pm$ 0.036
<i>Test Tajima (D)</i>	0.34747 <sup>ns</sup>	0.53829 <sup>ns</sup>	0.44941 <sup>ns</sup>	0.06406 <sup>ns</sup>

DP: Desvio padrão; <sup>ns</sup>: Não significativo ( $p > 0.10$ );

A análise genética intrapopulacional da *PMSP-3* mostrou que, assim como a *PfGLURP*, a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foi maior em Guajará (0.00311  $\pm$  0.00067) quando comparada a Cruzeiro do Sul (0.00146  $\pm$  0.00073) e Mâncio Lima (0.00288  $\pm$  0.00047). Da mesma forma, a diversidade haplotípica (Hd) foi maior em Guajará (0.600  $\pm$  0.129) quando comparada com Cruzeiro do Sul (0.282  $\pm$  0.142) e Mâncio Lima (0.556  $\pm$  0.90). Para avaliar se há pressão seletiva no gene *PMSP-3* foi realizado o teste D de Tajima. Os valores do teste D de Tajima foram: -0.274929, 1.40117 e 1.44510 nos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará e não se mostraram significativos, sugerindo que não há seleção significativa na região gênica que codifica o domínio C-terminal da *PMSP-3* (Tabela 14).

**Tabela 14: Diversidade genética intrapopulacional do gene *PfMSP-3* em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará.**

<b>Parâmetros</b>	<b>Cruzeiro do Sul (n = 13)</b>	<b>Mâncio Lima (n = 9)</b>	<b>Guajará (n = 6)</b>	<b>Total (n = 28)</b>
<i>Nº de Sítios Segregantes (S)</i>	2	2	2	2
<i>Diversidade nucleotídica (<math>\pi</math>) <math>\pm</math> DP</i>	0.00146 $\pm$ 0.00073	0.00288 $\pm$ 0.00047	0.00311 $\pm$ 0.00067	0.00234 $\pm$ 0.00035
<i>Número médio de diferenças nucleotídicas (k)</i>	0.28205	0.55556	0.60000	0.45238
<i>Nº de haplótipos (h)</i>	2	2	2	2
<i>Diversidade haplotípica (Hd) <math>\pm</math> DP</i>	0.282 $\pm$ 0.142	0.556 $\pm$ 0.90	0.600 $\pm$ 0.129	0.452 $\pm$ 0.067
<i>Test Tajima (D)</i>	-0.27429 <sup>ns</sup>	1.40117 <sup>ns</sup>	1.44510 <sup>ns</sup>	1.212636 <sup>ns</sup>

DP: Desvio padrão; <sup>ns</sup>: Não significativo ( $p > 0.10$ );

### **3.3.3.7. Substituição de aminoácidos de *PfGLURP* e *PfMSP-3* nos isolados brasileiros**

As sequências de aminoácidos da *PfGLURP* obtidas nesse estudo foram alinhadas e comparadas com a sequência referência 3D7 e com isolados provenientes de diferentes regiões da África, Ásia e Américas (Tabela 15). Podemos observar alterações de aminoácidos que ocorreram em nosso estudo e em outros isolados da África, Ásia e Américas (K125Q, S194T, V200E, V207G, Q208E, L214F, S223P, K269E, K284E, G309Q e K314Q). Entretanto, também foram identificadas trocas de aminoácidos presentes apenas nesse estudo (S88T, N90D, R91T, K93Y, I95T, G97V, L100K, E144K, S148R, L250F, P338S, Q356R, E403K, N436K, H518L e E519V/Q), assim como não encontramos algumas trocas de aminoácidos identificadas previamente em outras localidades (F110L, D113N, N123X, E138K, D189G, I197V, N361Y, K369R, N392Y, D422N e A506S).

**Tabela 15: Sítios de aminoácidos polimórficos da região R0 da *PfGLURP* presentes no Brasil e em outras regiões do mundo.**

Strain	GLURP																																										
	88	90	91	93	95	97	100	110	113	123	125	138	144	148	189	194	197*	200	207	208	214	223	250	269	284	309	314	338	356	361	369	392	403	422	436	506	518	519*					
3D7	S	N	R	K	I	G	L	F	D	N	K	E	E	S	D	S	I	V	V	Q	L	S	L	K	K	G	K	P	Q	N	K	N	E	D	N	A	H	E					
I							L	N			E				G			E							E																		
II											Q							E							E	Q	Q																
III											Q				G			E																									
FUP.SP							L	N	X		E							E							E																		
B1870											Q							E						E		Q	Q																
M0											Q							E						E	R																		
7G8							L				E					T	V	E	G	E	F	P		E	E	Q	Q																
B1											Q					T		E	G	E	F	P		E	E	Q	Q																
GB4											Q				G			E									Q																
KH1											Q							E							E																		
KH2											Q							E							E																		
NF54											Q							E							E																		
HB3											Q					T		E	G	E	F	P		E	E	Q	Q																
M6															G			E																									
D25											Q							E																									
M5.3											Q							E						E		R																	
M14											Q							E						E		R																	
K1											Q							E						E		Q																	
D50											Q	K						E						E																			
M1											Q							E																									
M4											Q							E						E																			
D28											Q							E																									
D4403											Q				G			E																									
D7											Q							E																									
BEA isolates	S/T	N/D	R/T	K/Y/*	I/T	G/V	L/K				Q		E/K	S/R		S/T	I	E	V/G	Q/E	F/L	S/P	L/F	K/E	K/E	G/Q	K/Q	P/S	Q/R						E/K	N/K		H/L	E/V/Q				

AEB= áreas endêmicas brasileiras. I=M7201, IT. II= B1804, B1882. III= L1, D41, H1, B1866. Os sítios em rosa representam os sítios de troca de aminoácidos que não estão presentes neste estudo. Sítios marcados com \* representam substituições sinônimas. Os sítios em azul representam as trocas de aminoácidos que estão presentes em comum com este estudo e os outros isolados. Sítios em branco significam trocas de aminoácidos observadas apenas neste estudo (Adaptado do banco de dados Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*)).

As sequências de aminoácidos da *PfMSP-3* obtidas nesse estudo também foram alinhadas e comparadas com a sequência referência 3D7 e com isolados provenientes de diferentes regiões da África, Ásia e Américas (Tabela 16). Podemos observar que em nosso estudo encontramos somente uma substituição de aminoácido previamente descrita (K169R), enquanto alguns polimorfismos já descritos (E161G, K162Q/R, A163V, K164E, N165K/E, A166D/Y, E168Q, F198S, K222E e E245G) não estavam presentes nos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará. No entanto, nesse estudo foram encontradas duas trocas de aminoácidos na mesma posição (Y167P/H) não evidenciada em nenhum isolado descrito na literatura.

**Tabela 16: Sítios de aminoácidos polimórficos da região C-terminal da *PfMSP-3* presentes no Brasil e em outras regiões do mundo.**

MSP-3												
Cepa	161	162	163	164	165	166	167	168	169	198	222	245
3D7	E	K	A	K	N	A	Y	E	K	F	K	E
I		Q	V	E	K	D			R			
II	G		V	E	K	D			R			
Nigerian051			V	E	E	Y		Q	R			
Nigerian077	G		V	E	E	Y		Q	R			
Nigerian002	G		V	E	E	Y		Q	R			
K1-S22	G		V	E	K	D			R			G
K1-S23	G		V		K	D			R	S		
K1-C5	G		V	E	K	D			R		E	
K1-C43		R	V	E	K	D			R			
K1-C33		Q	V	E	K	D						
AK152	G			E		D			R			
Isolados AEB							P/H		R			

AEB= áreas endêmicas brasileiras. I= AK158, AK152\_d56, AK144\_d40, AK092\_d0, K1-k81, Nigerian089, Nigerian 050, Thai036, Thais008, Thai094b, Thai100, Thai045. II= KH1, IT, AK182, AK221\_d0, AK183\_d19, AL174\_d0, AK155\_d0, AK150\_d42, AK127\_d45, AK062\_d84, AK042\_d0, AK246\_d0, K1-S18, K1-S7, K1-K62, K1-K47, K1-C22, K1-C14, K1-C8, K1-C3, K1-C2, Nigerian161, Nigerian160, Nigerian152, Nigerian100, Nigerian035, Thai074, Thai013, Thai011, Thai006, Thai056, Thai023, FVO, K1-C25, K1-C9. Isolados K1-C11, K1-S2, K1S16, HB3, GB4 = 3D7. Os sítios em rosa representam os sítios de troca de aminoácidos que não estão presentes neste estudo. Os sítios em azul representam as trocas de aminoácidos que estão presentes em comum com este estudo e os outros isolados. Sítios em branco significam trocas de aminoácidos observadas apenas neste estudo (Adaptado do banco de dados Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*)).

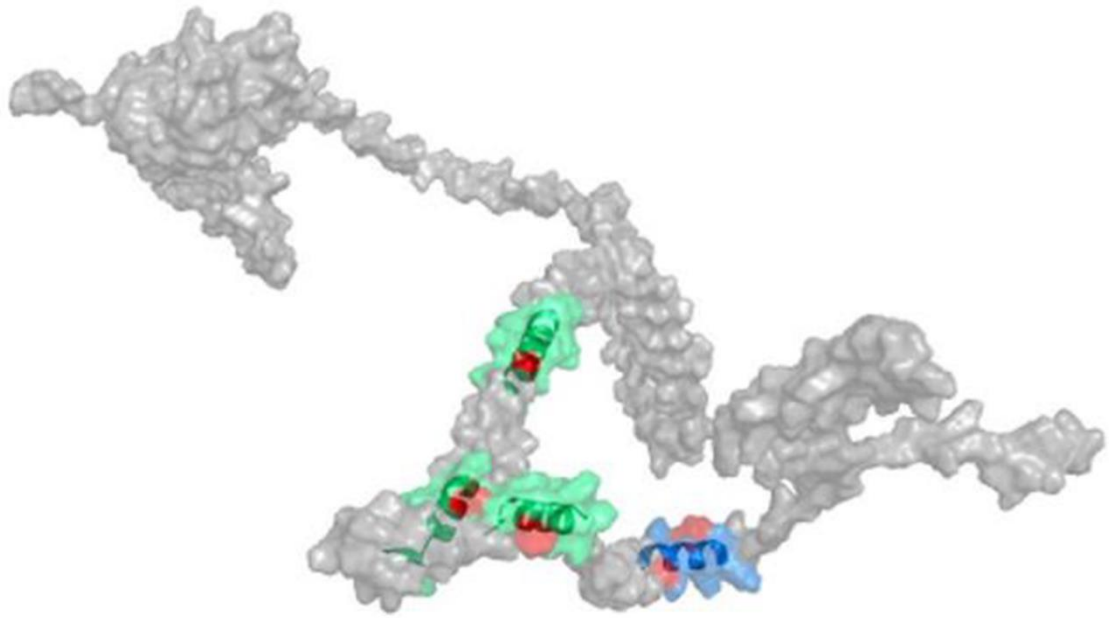
### **3.3.3.8. Modelagem molecular e impacto dos polimorfismos nos potenciais epítomos de células B e T**

A modelagem molecular da GMZ2.6c foi realizada utilizando o servidor *Robetta* a partir da sequência referência *P. falciparum* 3D7 (Figura 28). Notando a diversidade genética encontrada nos genes de interesse desse estudo e o fato de que os SNPs não-sinônimos identificados podem ter impacto sobre o dobramento das proteínas, assim como interferir na imunogenicidade de epítomos, as sequências completas das proteínas *PfGLURP* e *PfMSP3* foram analisadas para a avaliação do impacto desses polimorfismos nos epítomos previamente identificados (**Artigo 2 e Resultados complementares 3.3.1.3**).

Dentre os epítomos previamente identificados para a *PfGLURP* e *PfMSP-3*, 9 (P6, P7, P10, P11, S2, S3, MSP-3a, MSP-3b e DG210) apresentaram *score* abaixo de 0.5 e foram descartados das análises. Considerando os polimorfismos que ocorreram dentro dos epítomos de células B (P2: L250F; P4: K284E; P5: K314Q e G309Q; e P10: E403K), analisamos os *scores* de predição dos epítomos para verificar se esses polimorfismos impactavam sua antigenicidade. Apenas polimorfismos que ocorreram na *PfGLURP* estavam inseridos em epítomos lineares de células B preditos. Aos analisarmos os polimorfismos dentro das regiões dos epítomos preditos, L250F e K284E resultaram em uma pequena diminuição no *score* de predição. Quando K314Q ocorre sozinho, há uma ligeira diminuição no *score* de predição, no entanto, quando esse polimorfismo ocorre em conjunto com G309Q um aumento do *score* de predição é observado. Interessantemente, G309Q sozinho resulta em um grande aumento na pontuação predita. Curiosamente, o polimorfismo E403K resulta em um aumento no *score* de predição do epítomo P10, entretanto, seu *score* continua abaixo do ponto de corte de nosso estudo (0.5).

Dentre os epítomos de células T preditos (Tabela 4), foram encontrados polimorfismos somente nos epítomos Gp1 e Gp2 da *PfGLURP*. No epítomo Gp1 identificamos o polimorfismo L214F, ocorrendo sozinho ou em conjunto do polimorfismo Q208E, que também está presente na sequência do epítomo Gp2. Os epítomos da *PfMSP-3* e *Pfs48/45* foram conservados e não apresentaram nenhum polimorfismo dentro de suas regiões.





**Figura 28: Estrutura de modelagem e análise *in silico* de epítomos da GMZ2.6c.** Modelo em 3D da GMZ2.6c meramente ilustrativo, indicando os polimorfismos encontrados (em vermelho) nos epítomos de células B (em verde) e T (em azul).

## 4. DISCUSSÃO

Dada a complexidade do ciclo de vida e das interações parasito-hospedeiro, bem como a extensa variabilidade genética dos parasitos e os mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, uma vacina ideal contra a malária deve ser dirigida contra antígenos expressos em diferentes fases de desenvolvimento do *P. falciparum*. Nesse contexto, a proteína recombinante GMZ2.6c demonstrou ser uma promissora candidata à vacina antimalárica multiestágio.

Baseado nesse racional e considerando os diferentes trabalhos que apontam a GMZ2 (99–104,174) e *Pfs48/45* (119,155,159) como potenciais candidatas a vacina de estágio sanguíneo e bloqueadora de transmissão, respectivamente, nosso estudo objetivou avaliar o perfil das respostas imune humoral (**Artigo 1**) e celular contra a proteína recombinante GMZ2.6c e seus componentes (MSP-3, GLURP e *Pfs48/45*) em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira, identificar e validar os epítomos de células B (**Artigo 2**) e T imunodominantes nas populações estudadas e, avaliar a extensão dos polimorfismos genéticos parasitário e sua influência na resposta imune específica, gerando dados que possam ressaltar o potencial da GMZ2.6c como uma candidata a vacina antimalárica.

A resposta humoral contra a proteína recombinante GMZ2.6c e seus fragmentos (MSP-3, GLURP e *Pfs48/45*) foi avaliada em indivíduos que vivem em três municípios da Amazônia Brasileira: Cruzeiro do Sul (CZS) e Mâncio Lima (ML), no estado do Acre, e Guajará (GJ), no estado do Amazonas. A maioria dos indivíduos de CZS, ML e GJ, possuíam anticorpos contra a GMZ2.6c, independente da classe, indicando que a GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos de indivíduos residentes nessas localidades. A antigenicidade da GMZ2.6c parece ser independente dos níveis de endemicidade, visto que a prevalência de indivíduos com anticorpos que reconheciam a GMZ2.6c foi similar nas três áreas de estudo. Somente 68/299 (22.7%) dos indivíduos não possuíam anticorpos contra a GMZ2.6c (ou seus fragmentos individuais). A não detecção de anticorpos anti-GMZ2.6c nesses indivíduos poderia estar associada a ausência de um contato prévio com o parasito. Contudo, apenas 4 indivíduos não reportaram episódios anteriores de malária e 10 reportaram infecções anteriores

apenas por *P. vivax*. A não detecção desses anticorpos poderia também estar relacionada com a exaustão funcional de subconjuntos de células T e B, bem descrito em infecções virais e igualmente considerado para malária (175–181). Além das células B de memória atípicas e da exaustão de células T CD4, a ausência de anticorpos específicos pode depender de outros fatores, como a intensidade da infecção, coinfeções, desnutrição, ou fatores genéticos do hospedeiro humano.

Ensaio clínico em indivíduos *naive* e naturalmente expostos a malária na África para avaliar a segurança e imunogenicidade da GMZ2 mostraram uma resposta mais potente contra a GMZ2 quando comparado com seus componentes individuais (99,100). No presente estudo foi feita uma observação semelhante, uma maior prevalência de indivíduos com anticorpos e níveis mais elevados de anticorpos anti-GMZ2.6c comparado aos seus componentes individuais, o que pode sugerir um efeito aditivo de GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 quando inseridos numa mesma construção, e que GMZ2.6c pode ser uma candidata a vacina antimalárica mais promissora do que seus componentes individuais. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com dados anteriores no qual a maior prevalência de indivíduos com anticorpos anti-GMZ2 quando comparados a aqueles contra a GLURP e MSP-3 foi observada em indivíduos naturalmente expostos a malária na Etiópia (104).

Estudos independentes avaliaram o potencial da resposta imune humoral contra GLURP e MSP-3 em conferir imunidade clínica à malária em áreas endêmicas da África com diferentes níveis de transmissão. Em todos eles, GLURP e MSP-3 demonstraram grandes propriedades imunogênicas (117,140,141,182,183). No presente estudo, GLURP e MSP-3 demonstraram ser amplamente reconhecidas por anticorpos naturalmente adquiridos, principalmente nas áreas de alta endemicidade de CZS e ML. Entretanto, a prevalência de indivíduos com anticorpos anti-Pfs48/45 variou entre 24-40%. Essas prevalências são inferiores às aquelas observadas na Região Central da Gana para a mesma construção (Pfs48/45.6c) (184), possivelmente refletindo diferenças na exposição a gametócitos, como relatado previamente em um estudo longitudinal em uma área hipoendêmica da Tanzânia (119).

Os dados apresentados nesse estudo mostraram que anticorpos IgG anti-GMZ2.6c são mais frequentes e apresentam níveis mais elevados no grupo CZS quando comparados aos grupos ML e GJ. Considerando que é amplamente aceito que anticorpos IgG são os principais mediadores de proteção contra a malária clínica (107,185), podemos supor que sua importante presença, principalmente no grupo CZS, pode refletir um grau de imunidade antiparasitária mais elevado. A maior prevalência e níveis de anticorpos no grupo CZS pode estar relacionada ao *background* genético da população estudada, uma vez que as formas alélicas do HLA podem influenciar a capacidade do hospedeiro de montar uma resposta imunológica (120,186–188).

Indivíduos naturalmente expostos a malária possuíam, predominantemente, anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 contra a GMZ2.6c (e seus fragmentos individuais), um importante fato se considerarmos que a aquisição da imunidade protetora contra a malária resulta de um delicado balanço entre anticorpos citofílicos/não citofílicos e, que anticorpos não citofílicos IgG2 e IgG4 com a mesma especificidade podem bloquear mecanismos efetores (121,122,189,190). De fato, a interação entre os anticorpos citofílicos e receptores Fc de células fagocíticas podem levar a ativação celular e desencadear funções efetoras como fagocitose, produção de citocinas e quimiocinas, citotoxicidade, e a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (191). Anticorpos citofílicos também podem mediar a morte do parasito em cooperação com monócitos através do mecanismo de ADCI, além da opsonização dos merozoítos de *P. falciparum* (68,107,192).

Nossos dados mostraram que GLURP-R0 em indivíduos naturalmente expostos à infecção malárica induz uma resposta anticorpo predominante citofílica (IgG1 e IgG3), enquanto a MSP-3 induz uma resposta predominantemente IgG1. Fatores como a cumulativa exposição à malária, a idade dos indivíduos, o HLA e o polimorfismo dos FcR têm mostrado influenciar a distribuição das subclasses de IgG contra antígenos plasmodiais (143,145,148,193–195). Além disso, combinações específicas de citocinas e ativadores de células B têm mostrado induzir o *switch* para certas classes e subclasses em modelos experimentais (196). Experimentos *in vitro* com células B humanas e murinas têm identificado citocinas que induzem seletivamente a síntese de uma particular classe de imunoglobulina pela estimulação do rearranjo do DNA e transcrição seletiva de genes C<sub>H</sub> (197–199).

Os níveis de anticorpos IgG e IgM contra a GMZ2.6c e GLURP foram maiores em indivíduos parasitados quando comparados com indivíduos não parasitados. Esse resultado pode refletir a estimulação do sistema imune levando a produção de anticorpos antiplasmodiais, entre os quais anticorpos anti-GLURP, devido a infecção. Esse *booster*, em resposta à infecção parece induzir uma resposta anticorpos predominantemente citofílica (IgG1 e IgG3) que reconhecem GMZ2.6c e GLURP.

Níveis de anticorpos contra diversos antígenos plasmodiais parecem estar associados à idade e tempo de exposição em áreas endêmicas (120,168,200–205). No presente estudo, indivíduos com altos níveis de anticorpos IgG e IgG3 anti-GMZ2.6c eram mais velhos e apresentavam um maior tempo de residência em áreas endêmicas de malária. Além disso, pudemos observar uma correlação negativa entre a parasitemia e níveis de anticorpos IgG e IgG3 e uma correlação positiva entre o número de infecções anteriores de malária e os níveis de anticorpos IgG contra a GMZ2.6c. Esses dados indicam que a prevalência de indivíduos com anticorpos que reconhecem a GMZ2.6c e seus níveis aumentam com a exposição ao parasito e podem contribuir para a imunidade antimalárica. Entretanto, a resposta anticorpo contra as proteínas individuais (GLURP, MSP-3 e Pfs48/45) que constituem a GMZ2.6c não forneceu evidências de um possível papel protetor desses anticorpos.

O mapeamento de epítomos de células B foi realizado em todas as amostras que apresentaram anticorpos IgG para cada uma das proteínas recombinantes. Foram utilizados 13 peptídeos derivados da GLURP<sub>27-500</sub> previamente preditos como potenciais epítomos de células B (114), quatro peptídeos derivados da MSP-3<sub>155-249</sub>, um polipeptídeo reconhecido por anticorpos de indivíduos clinicamente imunes utilizando clones de uma biblioteca de DNA e seus três peptídeos sobrepostos (121,122) e, dois peptídeos derivados da *Pfs48/45* identificados nesse estudo por predição *in silico*.

O epítomo P11 foi identificado como epítomo de células B imunodominante da GLURP com uma alta frequência de respondedores e níveis de anticorpos IgG na população estudada. Esses dados corroboram com estudos anteriores em que P11 foi identificado como o epítomo imunodominante da GLURP em indivíduos residentes

do estado de Rondônia, também na Amazônia Brasileira (120), e em macacos *Saimiri sciureus* imunizados com uma proteína híbrida contendo a região R0 da GLURP e C-terminal da MSP-3 (206). Em contraste, somente 29% de adultos clinicamente imunes da Libéria apresentaram anticorpos contra P11, enquanto os epítomos imunodominantes foram P1, P3, P4 e S3 (114). As diferenças na imunodominância dos epítomos de células B da GLURP pode ser devido aos polimorfismos na região R0 da GLURP nos isolados de *P. falciparum* de diferentes áreas geográficas (133), as restrições genéticas da resposta de anticorpos contra epítomos da GLURP-R0 (120) ou as diferenças na intensidade de transmissão entre as áreas endêmicas (207).

Apesar da baixa prevalência de respondedores, os peptídeos P1, P3, P4 e S3 induziram níveis elevados de anticorpos IgG. Interessantemente, os epítomos P1, P3 e P4 possuem um motivo em comum (EPFPXQXHK) que parece ser alvo de anticorpos com reatividade cruzada (208). Da mesma forma, anticorpos purificados por afinidade contra o epítomo S3 podem reconhecer o peptídeo S4 derivado da região R2 da GLURP (205). Esses dados podem sugerir que os altos níveis de anticorpos contra esses epítomos pode ser resultado de anticorpos com reatividade cruzada.

Em nosso estudo, o peptídeo linear contendo a sequência de aminoácidos da DG210, derivado da MSP-3, também foi amplamente reconhecido por altos níveis de anticorpos IgG naturalmente adquiridos. Interessantemente, as prevalências e níveis de anticorpos contra os epítomos MSP-3c e DG210 foram semelhantes, sugerindo que a resposta anticorpos contra DG210 pode ser direcionada principalmente contra este epítomo na população de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará. Diversos estudos soropidemiológicos demonstraram perfis distintos de resposta anticorpos contra epítomos derivados do região C-terminal da MSP-3. O peptídeo MSP-3b é o epítomo imunodominante em indivíduos hiperimunes (121,122), enquanto indivíduos com diversos graus de exposição não apresentaram diferença na prevalência e níveis de anticorpos contra os epítomos MSP-3b, MSP-3c e MSP-3d (209). Anticorpos induzidos após imunização com MSP-3CT LPS foram dirigidos contra os peptídeos MSP-3c e MSP-3d (144,216), mas níveis semelhantes de anticorpos contra todos os peptídeos foram observados.

Nossos dados mostram que todos os epítomos imunodominantes da GLURP e MSP-3 são, principalmente, alvos de anticorpos citofílicos IgG1 e/ou IgG3 na população de estudo – predominantemente IgG3 contra o epítopo S3 e IgG1 contra os outros epítomos. A prevalência de anticorpos citofílicos contra os epítomos derivados da MSP-3 e GLURP também foi observada em indivíduos expostos a infecção natural na África (209,210) e em voluntários Europeus imunizados (149) associados com proteção clínica contra a malária por *P. falciparum*. Sabe-se que o *background* genético, graus de exposição da população ao parasito e a intensidade de transmissão de malária podem influenciar a distribuição das subclasses de IgG contra antígenos plasmodiais (193). Em conjunto, esses dados sugerem que características intrínsecas desses antígenos podem ser o principal fator que determina o perfil de resposta de anticorpos IgG citofílicos, levando a ativação de células B pela ligação de CD40 a CD40L expresso na superfície de células T CD4<sup>+</sup> ativadas, fornecendo o sinal coestimulatório e liberação de citocinas que influenciam o *switching* da subclasse de IgG (211,212).

A análise de correlação da resposta imune e os dados epidemiológicos mostraram que os níveis de anticorpos IgG1 contra os epítomos P1 e P11 da GLURP estavam positivamente correlacionados com a idade a tempo de residência em área endêmica de malária, enquanto os níveis de anticorpos IgG3 contra o epítopo DG210 da MSP-3 estavam associados com o número de infecções anteriores de malária. Além disso, os níveis de anticorpos IgG1 contra o epítopo P3 da GLURP foram negativamente correlacionados com o tempo desde a última infecção de malária. Esses dados podem refletir a exposição cumulativa destes indivíduos a infecções por *P. falciparum* e, possivelmente, a maturação do sistema imune ao longo do tempo (140), mas não forneceram evidências de um possível papel protetor desses anticorpos, uma vez que não foi observada qualquer relação entre a prevalência ou níveis de anticorpos específicos e a presença ou ausência de parasitos no sangue, sintomas e parasitemia no momento da coleta.

A maioria dos indivíduos respondedores para a proteína recombinante *Pfs48/45* (68.5%) apresentou anticorpos IgG detectáveis contra os dois epítomos preditos, validando a predição *in silico* de epítomos lineares de células B. Uma maior frequência de indivíduos com anticorpos anti-*Pfs48/45b* foi observada, apesar de nenhuma diferença nos níveis de anticorpos contra os dois epítomos.

Interessantemente, os níveis de anticorpos contra *Pfs48/45a* e *Pfs48/45b* foram similares àqueles contra a proteína recombinante (109). Esses resultados indicam que embora uma minoria de epítomos de células B sejam lineares (~10%) (213) eles podem ser um interessante alvo de anticorpos. Contudo, o epítomo de atividade de bloqueio de transmissão mais potente da *Pfs48/45* é conformacional (214) e, a produção de uma proteína desnaturada não induziu anticorpos funcionais em camundongos (215). Além disso, a imunização com a *Pfs48/45* revelou que muitos anticorpos sem atividade de bloqueio de transmissão reconhecem a região 6c da *Pfs48/45* (216). Estudos adicionais são necessários para a melhor compreensão da resposta humoral contra esses epítomos e sua possível atividade de bloqueio de transmissão.

Estudos revelaram que a alta eficácia no bloqueio de transmissão do anticorpo monoclonal 85RF45.1 contra o epítomo I é devido a sua habilidade de bloquear a função da *Pfs48/45* (216), e diversas subclasses de IgG podem contribuir com a atividade de bloqueio de transmissão. Curiosamente, a maior frequência de indivíduos com anticorpos IgG1 e IgG3 contra os epítomos *Pfs48/45a* e *Pfs48/45b*, respectivamente, e a menor proporção de anticorpos IgG2 e IgG4 contra os dois epítomos sugerem um possível papel da via clássica de ativação do sistema complemento. Embora, até o momento, não existem evidências da importância da interação entre anticorpos anti-*Pfs48/45* e o sistema complemento na atividade de bloqueio de transmissão, anticorpos contra outros antígenos de fase sexuada, como *Pfs230*, mostraram ter a sua atividade bloqueadora de transmissão aumentada na presença de componentes do sistema complemento humano (72).

Anticorpos específicos contra antígenos de fase sexuada também estão relacionados com idade e podem ser utilizados como marcadores de exposição, aumentando de acordo com a densidade de gametócitos (217–219), entretanto, nenhuma correlação com parâmetros epidemiológicos foi encontrada nesse estudo. Esse achado não é surpreendente visto que em áreas endêmicas de malária as infecções são determinadas por contagem de parasitos por microscopia e, normalmente, gametócitos ocorrem em baixas densidades. Além disso, nesse estudo, nenhum outro método mais sensível para detecção de gametócitos foi utilizado.



A resposta imune celular foi avaliada utilizando PBMCs de indivíduos expostos a infecção malárica não parasitados e parasitados por *P. falciparum*, criopreservadas para os estudos *ex vivo*, logo após o descongelamento, e *in vitro*, após a cultura celular na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3, Pfs48/45 e os mitógenos PMA e Ionomicina.

Nossos dados mostraram uma alta viabilidade celular após o descongelamento das amostras, menor em indivíduos parasitados por *P. falciparum* que em indivíduos não parasitados. A perda significativa da viabilidade celular em indivíduos parasitados pode estar relacionada à maciça ativação policlonal quando estimulada *in vivo* pelos antígenos parasitários induzindo a morte de diferentes tipos celulares. De fato, elevados percentuais de PBMCs em processo de apoptose têm sido descritos no decurso da infecção malárica humana (220–222). Em contrapartida, após cultura das PBMCs na ausência ou presença de diferentes estímulos, observamos uma extensa redução na viabilidade celular de linfócitos sem diferença significativa entre o percentual de células viáveis entre os indivíduos parasitados e não parasitados. Esses dados mostram que a redução da viabilidade dessas células é independente do estímulo utilizado e pode ser devido ao tempo prolongado de cultivo e a privação ou competição por fatores essenciais para a sobrevivência dessas células (223).

Estudos em modelos experimentais de camundongos tem demonstrado o papel essencial de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na resposta protetora contra a malária na fase eritrocítica (224–227). Ademais, a imunização de humanos com baixas doses de eritrócitos infectados por *P. falciparum* foi capaz de induzir uma resposta protetora contra parasitos do estágio sanguíneo, mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas produtoras de IFN- $\gamma$  (228). Considerando o importante papel da resposta imune mediada por células T, avaliamos a resposta de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como o perfil de ativação e caracterização funcional desses tipos celulares. Observamos uma maior proporção de células T CD4<sup>+</sup> estimuladas com os antígenos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 no grupo parasitado por *P. falciparum* quando comparado ao grupo não parasitado. Esses dados podem sugerir a expansão de linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos contra os antígenos GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 durante a infecção malárica e que a construção vacinal GMZ2.6c contendo esses três antígenos também foi capaz de estimular linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos

nos indivíduos parasitados por *P. falciparum*. De fato, linfócitos T CD4<sup>+</sup> são componentes fundamentais para a regulação da resposta imune do hospedeiro no decurso da infecção pelo *Plasmodium* (229,230). As células T CD4<sup>+</sup> são ativadas após o encontro com células apresentadoras de antígeno via MHC de classe II e se diferenciam em diferentes subconjuntos. As células com perfil Th1 são as principais secretoras de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , essenciais para a resposta imune protetora contra o *Plasmodium* (228,229). Além disso, linfócitos T auxiliar foliculares (Tfh) são indispensáveis para a ativação de linfócitos B, estimulando a mudança de classe e maturação de afinidade (46,51,229). Todavia, indivíduos previamente expostos não parasitados e parasitados por *P. falciparum* não apresentaram diferença significativa no percentual de células T CD4<sup>+</sup> na ausência e presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45, indicando que a infecção por *P. falciparum* e não os estímulos foi responsável pelo aumento do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> após o estímulo com GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45. Esses resultados corroboram com um estudo recente em que indivíduos expostos imunizados com a GMZ2 não apresentaram diferença significativa na proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> total e secretores de citocinas pró- e anti-inflamatórias antes e após a imunização (231), sugerindo que a exposição natural contínua ao parasito pode influenciar na ativação saturada de linfócitos T e/ou na ativação prévia de células dendríticas (232).

Em nosso estudo elevados percentuais de células T CD8<sup>+</sup> foram encontrados após o estímulo com GLURP no grupo parasitado por *P. falciparum*, enquanto nenhuma diferença foi observada no grupo não parasitado. Curiosamente, a proteína GLURP, dentre os componentes da GMZ2.6c, é a única também expressa na fase pré-eritrocítica, estando presente no vacúolo parasitóforo de esquizontes hepáticos (124,125). Sabe-se que linfócitos T CD8<sup>+</sup> são capazes de eliminar hepatócitos infectados através da liberação de granzima B e perforinas (61,62), bem como inibir o desenvolvimento intra-hepático do parasito pela produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (47), após o reconhecimento de peptídeos derivados do parasito apresentados por moléculas de MHC de classe I de células apresentadoras de antígenos ou hepatócitos infectados (230), e que linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos contra antígenos pré-eritrocíticos já foram descritos no sangue de indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária (233–235) e após vacinação (236–238). Esses dados sugerem que durante o estágio pré-eritrocito da infecção, células T CD8<sup>+</sup> específicas contra GLURP podem ser ativadas e persistirem durante o estágio

sanguíneo. Entretanto, não podemos excluir o fato de que uma robusta resposta de células T CD8<sup>+</sup> contra diversos antígenos de fase eritrocítica é ativada principalmente no baço como foi demonstrado em diferentes modelos experimentais de roedor (239,240). Além disso, foi recentemente demonstrado que linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem diretamente provocar a lise de reticulócitos infectados via MHC de classe I na malária por *P. vivax* (241,242). Apesar do aumento do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> após estímulo com GLURP, uma diminuição no percentual desses linfócitos após estímulo com GMZ2.6c foi observado no grupo parasitado por *P. falciparum* quando comparado ao grupo não parasitado. Uma hipótese para esse resultado é que a conformação da GMZ2.6c pode estar influenciando o processamento e subsequente apresentação de epítomos via MHC de classe I para os linfócitos T CD8<sup>+</sup>. De fato, foi demonstrado que a estrutura tridimensional da proteína GP120 do Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus* - HIV) (243), bem como, MSP-1 de *P. falciparum* (244) determina a imunodominância de seus epítomos, e essa modulação pode ser resultado do processamento proteolítico da proteína (245,246).

É amplamente aceito que a resposta imune humoral desempenha um papel fundamental na proteção contra as formas sanguíneas do *Plasmodium* (47). O desenvolvimento da resposta imune humoral requer o reconhecimento do antígeno do parasito pelos linfócitos B através do receptor BCR seguido da ativação dessas células pela interação com células T CD4<sup>+</sup>, levando a proliferação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos (247). Nossos resultados não demonstraram diferenças significativas entre o percentual de linfócitos B nos indivíduos não parasitados e parasitados por *P. falciparum ex vivo* e após o cultivo, contrastando com estudos anteriores em que um menor percentual de células B no sangue periférico de indivíduos durante a infecção aguda por *P. falciparum* e *P. vivax* foi observada (248,249). Também não observamos diferença significativa no percentual de linfócitos B na ausência e presença de diferentes estímulos. Esses dados corroboram com um estudo recente em que nenhuma diferença no perfil de células B foi observado após imunização com GMZ2 em indivíduos com exposição prévia ao *P. falciparum*, e que a proteção observada na Infecção Malárica Humana Controlada (*Controlled Human Malaria Infection* - CHMI) pode estar associada a imunidade naturalmente adquirida ao parasito (231). Em contrapartida, estudos anteriores detectaram células B de memória específicas contra a GMZ2 em crianças e adultos

imunizados residentes em áreas endêmicas de malária, apesar da forte reatividade decorrente da intensa exposição prévia (100,101). É importante enfatizar que em nosso estudo, não caracterizamos as subpopulações de linfócitos B. Sabe-se que indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária apresentam um atraso no desenvolvimento das células B de memória contra antígenos de fase sanguínea, atribuído a expansão de células B de memória atípicas em resposta a exposição cumulativa ao parasito (179–181,247). As células B de memória atípicas possuem uma menor resposta proliferativa e capacidade de diferenciação em plasmócitos secretores de anticorpos (180,250), que aliado as baixas frequências de células B de memória antígeno-específicas no sangue periférico (251) pode estar associado a semelhante resposta de células B na ausência e presença de diferentes estímulos.

A baixa ativação celular nos dois grupos, independente da presença ou ausência de estímulos, pode ser devido a maioria dos linfócitos T e B ativados serem submetidos a morte celular induzida por ativação, levando essas células ao processo de apoptose (252,253). Curiosamente, no grupo parasitado por *P. falciparum*, tanto as amostras cultivadas na ausência quanto na presença do estímulo GMZ2.6c, apresentaram uma maior ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e B quando comparado ao grupo não parasitado. Esse resultado pode ser devido à exaustão de células T CD4<sup>+</sup> e B (atípicas) durante a infecção malárica, potencializada após estímulo com antígenos derivados do parasito, enquanto a conformação da proteína GMZ2.6c pode levar ao reconhecimento de diferentes epítopos. Estudos tem demonstrado a expansão de células T CD4<sup>+</sup> (CD45RA<sup>+</sup>) expressando PD-1 e LAG-3 e de células B de memória atípicas em indivíduos expostos a transmissão contínua e parasitados por *P. falciparum*, fornecendo evidências de que a infecção por esse parasito provoca alterações fenotípicas indicativas de exaustão celular (180,254), bem como a redução da resposta proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> específicas e secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em modelo experimental de roedor (255). Importantemente, nesse estudo utilizamos a expressão de CD69 para avaliar a ativação celular. Tem sido demonstrado que apesar de uma forte ativação prévia de células T durante a infecção por *P. falciparum*, a ativação recente pode ser modulada negativamente pela expressão de CTLA-4 e PD-1, associado ao quadro clínico da infecção (256).

A infecção pelo *Plasmodium* induz uma resposta de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> antígeno específicas após a apresentação de epítopos derivados do parasito por células apresentadoras de antígeno via moléculas de MHC de classe I ou II, sinal co-estimulatório e produção de citocinas (257). Após a resolução da infecção, a maioria das células efectoras sofrem apoptose enquanto as células T de memória são mantidas e capazes de responder rapidamente a infecções secundárias (62). Em nosso estudo, perfis semelhantes de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> *naive*, em transição *naive*/memória e de memória foram encontrados nos indivíduos não parasitados e parasitados por *P. falciparum*, *ex vivo* ou após o cultivo independente do estímulo. Entretanto, quando caracterizamos as células de memória em central e efectora observamos maiores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória central no grupo parasitado por *P. falciparum* quando comparado ao grupo não parasitado após o cultivo na ausência ou presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP e Pfs48/45, enquanto o percentual de células T CD4<sup>+</sup> (independente da ausência ou presença de estímulos) e CD8<sup>+</sup> (após estímulo com GLURP e Pfs48/45) de memória efectora estavam reduzidos nos indivíduos parasitados por *P. falciparum*. Diante desse resultado, algumas hipóteses podem ser levadas em consideração. O fato de que uma maior proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória efectora *ex vivo* no grupo EXP, enquanto no grupo PF nenhuma diferença significativa entre os dois fenótipos foi encontrada pode sugerir que a infecção por *P. falciparum* por si pode levar a uma redução das células de memória efectora. No entanto, independente da ausência ou presença de diferentes estímulos observamos a inversão desse perfil fenotípico no grupo não parasitado, indicando que não somente a infecção, mas a exposição prévia pode levar a redução das células T de memória efectora. Por outro lado, não encontramos diferença significativa no perfil fenotípico dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> cultivados na ausência ou presença de estímulos e essa redução de células de memória efectora pode ser somente um reflexo do cultivo prolongado levando a morte por apoptose das células T com esse fenótipo na ausência de estímulo, bem como a estimulação crônica (62,258,259), ou resultado da exaustão celular caracterizada por uma reduzida capacidade de proliferação e funções efectoras em resposta a antígenos do parasito (255). Outra hipótese reside no fato de estudos em modelo experimental de camundongo e em indivíduos expostos ao *P. falciparum* terem demonstrado que as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória não tem o perfil alterado em resposta a reinfeção ou exposição crônica, mas sim a produção de citocinas parece apresentar uma resposta mais significativa

(180,258,260). De fato, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória efetora produtoras de IFN- $\gamma$  específicas contra MSP-1 de *P. falciparum* estão associadas com a exposição ao parasito (261), enquanto as células T de memória central produtoras de TNF- $\alpha$  e IL-2 estão associadas com a proliferação de células T e redução de parasitemia (262). Em nosso estudo o sobrenadante das culturas celulares foram armazenados no -70 °C para posterior avaliação do perfil de citocinas frente aos diferentes estímulos.

Apesar do vasto conhecimento acerca da resposta imune humoral, relativamente poucos epítomos de célula T localizados em um pequeno número de antígenos de *P. falciparum* foram identificados e caracterizados detalhadamente (263). O maior obstáculo na identificação de epítomos de células T consiste no fato de que genes que codificam moléculas HLA de classe I e II são extremamente polimórficos e estão sob uma forte pressão seletiva pelos parasitos da malária (264). As formas alélicas do HLA podem ter diferentes afinidades de ligação que contribuem para a aquisição variável da resposta imune (186). Assim, um dos pontos mais relevantes para o desenvolvimento de uma vacina a malária é identificar epítomos de células T que podem interagir de forma promiscua com múltiplas moléculas do HLA (265). Em nosso estudo, 12 peptídeos foram preditos como epítomos promíscuos de HLA classe I (5, 1 e 4 derivados da GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45*, respectivamente) e II (2 derivados da *Pfs48/45*) e, divididos em 4 pools.

Os quatro *pools* de peptídeos induziram uma resposta IFN- $\gamma$  em indivíduos com exposição prévia ao parasito com frequências que variam entre 13% e 39%. Esses dados corroboram com estudos anteriores que as infecções prévias por malária podem desencadear resposta de células T específica mesmo na ausência do parasito (235,266). Indivíduos parasitados com *P. falciparum* apresentaram frequências semelhantes de respondedores para os *pools* Ppp II e Gpp I que indivíduos previamente expostos ao parasito, entretanto nenhum deles apresentou resposta específica de célula T para o *pool* Ppp I, enquanto uma alta frequência de resposta de IFN- $\gamma$  (75%) foi observada contra o *pool* Mpp I. Esses dados podem ser um reflexo da estimulação do sistema imune, levando a ativação de clones específicos de células T, sugerindo que a maior frequência de indivíduos respondedores a Mpp I no grupo infectado por *P. falciparum* pode ser devido a um *booster* na resposta imunológica específica previamente existente em indivíduos

naturalmente expostos a infecção malárica, corroborando com dados anteriores mostrando que a resposta proliferativa e secreção de IFN- $\gamma$  a após estimulação com um longo peptídeo sintético (MSP3-LPS) e seus peptídeos sobrepostos foram potencializadas em indivíduos imunizados residentes em Burquina Faso (267). Importaneamente, a análise de predição *in silico* indicou que esses epítomos são reconhecidos por cerca de 50-60% dos alelos de HLA de classe I ou II mais comuns mundialmente com afinidades de ligações distintas. Sabe-se que peptídeos restritos a determinados alelos induzem uma resposta de células T em indivíduos que possuem o alelo de HLA correspondente (266). Em nosso estudo, não foi realizada a caracterização dos antígenos leucocitários humanos nos indivíduos de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará. Estudos serão necessários para avaliar a restrição por moléculas do HLA de classe I e II desses epítomos e a presença desses alelos na população estudada.

Indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira que possuíam uma resposta IFN- $\gamma$  contra os *pools* Mpp I e Gpp I apresentaram um maior tempo desde a última infecção de malária quando comparado a indivíduos não respondedores. Esses dados podem indicar um possível papel protetor de clones específicos de células T contra o epítomo Mp I e os epítomos inseridos dentro do *pool* Gpp I. Apesar de estudos demonstrarem a presença de epítomos de célula T imunogênicos em indivíduos naturalmente expostos a malária e imunizados com longos peptídeos sintéticos derivados da GLURP e MSP-3 (209,210), não há evidências do papel dessas células na proteção contra a infecção malárica. De fato, enquanto anticorpos específicos tem, classicamente, demonstrado mediar proteção contra a fase eritrocítica e as manifestações clínicas em humanos, alguns trabalhos mostram o papel crucial de resposta de células T antígeno específicas no controle da infecção de fase sanguínea (62,228,268), apesar dos eritrócitos não expressarem moléculas de HLA. Estudos adicionais serão necessários para melhor compreensão e caracterização da resposta de células T contra o epítomo Mp I e os epítomos inserido no *pool* Gpp I.

Considerando que a extensa diversidade genética exibida pelo *P. falciparum* pode ser um fator importante para a evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro, a presença de polimorfismos nas regiões genéticas que codificam as proteínas que compõem a GMZ2.6c pode modular a resposta imune específica.

Assim, a identificação e avaliação de polimorfismos nas regiões potencialmente antigênicas dos componentes da GMZ2.6c em isolados de *P. falciparum* que circulam em áreas endêmicas Brasileiras é de fundamental importância.

A análise por PCR evidenciou a presença de apenas um fragmento para os domínios da *PfGLURP*, *PMSP-3* e *Pfs48/45*, descartando a presença de polimorfismos de tamanho. Dos 67 isolados coletados, 46, 28 e 50 foram amplificados para a *PfGLURP*, *PMSP-3* e *Pfs48/45*, respectivamente. A não amplificação dos fragmentos de interesse em alguns isolados pode ser devido à presença de polimorfismos nos sítios de anelamento dos *primers*, impedindo o anelamento correto e posterior extensão da fita de DNA (269).

Apesar da região R0 da GLURP ser mais conservada que as regiões R1 e R2 (130–133), nosso estudo demonstrou a presença 33 polimorfismos em sítios nucleotídicos, sendo 31 substituições não sinônimas e 2 substituições sinônimas, resultando na identificação de 25 variantes genotípicas da sequência referência 3D7. A maior frequência de SNPs não-sinônimos no segmento gênico que codifica a GLURP-R0 corrobora com trabalhos anteriores que mostram que substituições sinônimas são raras no genoma do *P. falciparum* (270). A diversidade genética exibida pela GLURP pode estar ligada ao fato de que genes que codificam proteínas alvos do sistema imunológico estão sob forte pressão seletiva, como um mecanismo de evasão do parasito do sistema imune (271). Em nosso estudo, os SNPs mais frequentes foram A373C e T599A, resultando nas substituições K125Q e V200E, encontrados em todos os isolados. Esses polimorfismos, além de 11 outros sítios polimórficos, já foram descritos em diversos isolados provenientes de diferentes regiões geográficas, incluindo Kanbauk em Myanmar, Dielmo no Senegal e Rondônia no Brasil (272). Entretanto, é importante ressaltar que 16 novos polimorfismos foram identificados nos isolados que circulam em áreas endêmicas Brasileiras. Não obstante, quando comparamos as sequências encontradas nesse trabalho com a cepa B1 (cepa de laboratório de origem Brasileira) uma menor variabilidade genética é observada. Esse dado não é surpreendente, visto que linhagens de laboratório tendem a ser relativamente similares aos isolados coletados na mesma área de sua origem (272).



Em nosso estudo, o segmento gênico que codifica a região C-terminal da MSP-3 se mostrou conservado, corroborando com dados anteriores que mostram que apesar da região N-terminal ser altamente polimórfica, limitados polimorfismos são encontrados na região C-terminal (145–148,273). Nos isolados proveniente de CZS, ML e GJ foram identificados somente 3 SNPs não sinônimos, sendo dois no mesmo códon (T499C e A500C) resultando na substituição Y193P/H e um na posição A506G, resultando na substituição K169R. O polimorfismo Y193P/H esteve presente somente nos isolados desse estudo, enquanto K169R é amplamente encontrado em isolados de diversas regiões endêmicas. No entanto, 10 outros sítios polimórficos encontrados em outras regiões geográficas do mundo não foram observados nesse estudo (273). O limitado polimorfismo encontrado na região C-terminal da MSP-3 pode ser resultado de seu papel essencial na oligomerização de proteínas (144,274) e no processo de invasão do merozoíto mediando a ligação com os eritrócitos (275).

Proteínas provenientes de estágios sexuais sofrem uma menor pressão do sistema imune, conseqüentemente, possuem um menor número de polimorfismos (112). A análise de sequenciamento genético revelou que a região gênica que codifica o domínio III da *Pfs48/45* é altamente conservada, não apresentando nenhum SNP nos 45 isolados sequenciados. Resultados semelhantes foram encontrados em isolados proveniente do Amapá, outro estado endêmico no Brasil (276), Madagascar e Camboja (277), entretanto um limitado número polimorfismos já foi identificado em outras áreas endêmicas de malária (156–158,276,277) associados a regiões geográficas específicas.

Genes de *P. falciparum* que codificam proteínas imunogênicas estão sob forte pressão seletiva para acumular mutações. Partindo dessa premissa e pelo fato de que as proteínas GLURP e MSP-3 são amplamente reconhecidas por células T e anticorpos de indivíduos residentes em áreas endêmicas brasileiras de malária, avaliamos a possibilidade dos genes que codificam GLURP e MSP-3 estarem sofrendo pressão seletiva. Não observamos diferenças no padrão de polimorfismo nos genes que codificam a região R0 da GLURP e C-terminal da MSP-3 entre as três localidades. Esse dado está em concordância com estudos anteriores na Região Amazônica em que não foi possível observar isolamento por distância ou grande variabilidade entre populações com pouca distância entre si (278,279). De

fato, a proximidade dos municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará permitem um grande fluxo de genes do genoma do *P. falciparum* entre as populações, fator que associado a migração de pessoas, propicia a diversidade genética do parasito e favorece a difusão de cepas parasitárias (280) entre as localidades. Além da pressão seletiva outras forças como deriva genética, mutação, endocruzamento, recombinação, efeitos gargalos e isolamento por distância atuam no aumento e/ou redução da variabilidade genética de uma população. Sabe-se que as populações de *P. falciparum* se estruturam de formas diferentes em distintas regiões geográficas e que países da América do Sul apresentam menor diversidade genética quando comparado a países Africanos, entretanto altos níveis de variação geográfica entre os países sul-americanos é observada (281). Ademais, estudos tem demonstrado que a diversidade genética de antígenos de fase sexuada está, principalmente, estruturada com base na origem geográfica e intensidade de transmissão, apresentando uma variação na diversidade de polimorfismos, enquanto a diversidade genética de antígenos expressos em merozoítos não possui relação com a estruturação geográfica do parasito, mas sim com a pressão seletiva, e níveis similares de diversidade genética são encontrados em diferentes áreas endêmicas de malária (282). Essas observações vão de acordo aos nossos resultados, em que a alta conservação da região gênica que codifica o domínio III da *Pfs48/45* foi observada, contrastando com o limitado número de polimorfismos encontrado na mesma região em países de alta endemicidade da África, podendo ser resultado da menor intensidade de transmissão de *P. falciparum* nas localidades estudadas. A pouca distância entre as populações estudadas e a estruturação populacional do parasito nas áreas da Amazônia Brasileira podem influenciar no perfil da resposta imune e pode nos auxiliar a avaliar de que forma os polimorfismos encontrados no nosso estudo podem ser fixados ou modificados durante o tempo.

A análise dos genes *PfGLURP* e *PfMSP-3* evidenciou uma gama de polimorfismos que contribuíram para a geração da variabilidade haplotípica e nucleotídica. Essa variedade haplotípica e nucleotídica é uma das formas do parasito de evadir o sistema imune do hospedeiro, através da acumulação de mutações não-sinônimas, que irão acarretar a variação adaptativa, mantida pela seleção balanceada (283). O propósito do teste D de Tajima é identificar o desvio de neutralidade, ou seja, indicar processos como seleção balanceadora, expansão populacional e varreduras seletivas. Os valores positivos são indicativos de seleção

balanceadora e gargalos populacionais, enquanto valores negativos são indicativos de seleção purificadora ou expansão populacional (170). Em nosso estudo, a análise genética da população identificou valores positivos no teste D de Tajima nos três municípios estudados para a *Pf*GLURP, enquanto a *Pf*MSP-3 valores positivos foram identificados para Mâncio Lima e Guajará e negativos para Cruzeiro do Sul. Entretanto, não observamos valores estatisticamente significantes, sugerindo que não há seleção significativa nas regiões gênicas que codificam os domínios R0 da *Pf*GLURP e C-terminal da *Pf*MSP-3. Esses dados diferem de estudos prévios em que uma forte seleção balanceadora no gene que codifica a *Pf*MSP-3 (146,284) e purificadora no gene que codifica a *Pf*GLURP (271) foram encontrados. Contudo, vale ressaltar que esses estudos consideraram os genes completos que codificam essas proteínas.

Polimorfismos genéticos em sequências codificantes de epítomos imunodominantes podem alterar ou interromper o reconhecimento desses epítomos por células T e B, consistindo em um importante gargalo para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica (285). Assim, nosso trabalho avaliou a predição *in silico* de potenciais epítomos de células B e T das proteínas MSP-3 e GLURP e o possível impacto dos polimorfismos encontrados na predição desses epítomos.

A variação de aminoácidos nas regiões potencialmente antigênicas de célula B foi observada apenas na GLURP. A maioria dos polimorfismos não-sinônimos encontrados não impactou os epítomos preditos. Contudo, os polimorfismos L250F (no epítopo P2) e K284E (no epítopo P4), quando ocorrem juntos, e K314Q (no epítopo P5) diminuem o *score* de predição do epítomos. Interessantemente, os polimorfismos G309Q e K314Q (epítopo P5) aumentaram o *score* de predição desse epítopo, podendo ser um reflexo do drástico aumento do *score* de predição causado pela substituição G309Q. Além disso, o polimorfismo E403K (epítopo 10) aumentou o *score* de predição desse epítopo, entretanto continuou não sendo um potencial epítopo de células B, corroborando com os dados do mapeamento epitópico. Esses dados podem sugerir que a diferença na imunodominância dos epítomos de células B encontradas nesse estudo (**Artigo 2**) pode estar relacionada com a presença desses polimorfismos, visto que os epítomos P3 e P4 foram imunodominantes em outras áreas endêmicas (114), enquanto poucos indivíduos residentes de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará possuíam anticorpos que reconheciam esses

epítomos, apesar dos altos níveis de anticorpo. Curiosamente, na população de estudo, as substituições G309Q e K314Q ocorreram sempre juntas em 31/42 (73.8%) isolados, apesar de não ser considerado um epítomo imunodominante essa substituição pode ter apresentado um considerável aumento na frequência de indivíduos respondedores a esse peptídeo, visto que anticorpos purificados de adultos clinicamente imunes na África não foram capazes de reconhecer P5 (114). Além dos epítomos de células B, o impacto dos polimorfismos nos epítomos de célula T foi avaliado. Assim como para os epítomos de célula B, a variação de aminoácidos nos potenciais epítomos de célula T foi observada apenas para a GLURP, ressaltando o potencial do parasito de gerar mutações randômicas que podem ou não favorecer a diversidade em regiões epitópicas envolvidas na proteção (285). Dois polimorfismos não sinônimos (Q208E e L214F) estavam localizados em 2 epítomos de célula T (Gp1 e Gp2), entretanto nenhum impacto no possível potencial antigênico desses epítomos foi observado. Embora estudos tenham demonstrado que polimorfismos presentes em epítomos preditos não alteram o score de antigenicidade dos epítomos (286,287), outros relatam que substituições de aminoácidos podem reduzir a afinidade de ligação até levar a perda de propensão de ligação (288,289). Em nosso trabalho, foi possível observar polimorfismos que podem alterar o score de predição do epítomo, assim como não causar impacto no potencial do epítomo predito.

Em conjunto, nossos dados mostraram que a proteína recombinante GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos naturalmente adquiridos de indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária no Brasil com diferentes níveis de transmissão. A maior prevalência e níveis de anticorpos contra a GMZ2.6c quando comparada com seus fragmentos individuais pode sugerir um efeito aditivo de GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 quando inseridos na mesma construção e pode contribuir com a imunidade antiparasitária. O maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> estimulados com GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 e linfócitos T CD8<sup>+</sup> com GLURP em indivíduos parasitados por *P. falciparum* sugerem a expansão dessas células em decorrência a infecção malárica, contudo a resposta de linfócitos B foi limitada. A identificação de múltiplos epítomos de células B e T derivados da GLURP, MSP-3 e Pfs48/45 aliados ao limitado polimorfismo na região R0 da GLURP e C-terminal da MSP-3, extrema conservação do domínio III da Pfs48/45 e o baixo

impacto desses polimorfismos nos epítomos de células B e T, evidenciam a importância da GMZ2.6c como uma candidata a vacina antimalárica multiestágio.

## 5. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pretendemos:

- Aumentar o número amostral nos ensaios de resposta celular contra a proteína recombinante GMZ2.6c e seus fragmentos e contra os epítos de células T nos ensaios de ELISpot;
- Analisar a presença de citocinas no sobrenadante do cultivo celular na presença dos estímulos GMZ2.6c, GLURP-R0, MSP-3 C-terminal e *Pfs48/45* 6c por CBA;
- Avaliar o papel funcional de anticorpos anti-MSP-3 e anti-GLURP sobre o crescimento *in vitro* de *P. falciparum*, em presença e ausência de monócitos, e em ensaios de fagocitose;
- Avaliar o papel funcional de anticorpos anti-*Pfs48/45* no bloqueio da fertilização no hospedeiro invertebrado em Ensaio Padrão de Alimentação por Membrana;
- Caracterizar os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classes I e II e estudar sua associação com as respostas imune celular e humoral contra as proteínas MSP-3, GLURP e *Pfs48/45*;
- Aumentar o número amostral de isolados de *P. falciparum* coletados em Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará;
- Desenhar novos primers para amplificar as regiões gênicas que codificam os domínios R0 da GLURP, C-terminal da MSP-3 e III da *Pfs48/45* dos isolados que não foram amplificados e/ou sequenciados;

## 6. CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos dados permitiram concluir que:

- A proteína GMZ2.6c é amplamente reconhecida por anticorpos IgG e IgM naturalmente adquiridos de indivíduos residentes em áreas endêmicas Brasileiras de malária, com diferentes níveis de transmissão;
- A maior prevalência e níveis de anticorpos contra a GMZ2.6c quando comparado aos seus componentes individuais sugere o efeito aditivo de GLURP-R0, MSP-3 C-terminal e *Pfs48/45.6c* quando inseridos na mesma construção;
- As proteínas recombinantes GMZ2.6c, GLURP e MSP-3 são preferencialmente reconhecidas por anticorpos das subclasses IgG1 e IgG3 nas populações estudadas;
- Entre os componentes individuais da GMZ2.6c, a proteína GLURP foi mais imunogênica nas populações estudadas;
- Anticorpos contra as proteínas recombinantes GMZ2.6c e GLURP parecem aumentar com a exposição ao parasito e podem contribuir com a imunidade antiparasitária;
- O maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> estimulados com GMZ2.6c, GLURP, MSP-3 e *Pfs48/45* e linfócitos T CD8<sup>+</sup> com GLURP em indivíduos parasitados por *P. falciparum* sugerem a expansão dessas células em decorrência a infecção malárica;
- Os epítomos P11 da GLURP, MSP-3c e DG210 da MSP-3 e *Pfs48/45a* e *Pfs48/45b* da *Pfs48/45* foram os epítomos de células B imunodominantes dessas proteínas na população estudada;

- Os quatro *pools* de peptídeos foram reconhecidos por células T de indivíduos residentes em áreas endêmicas Brasileiras de malária;
- Os segmentos gênicos que codificam as regiões R0 da GLURP e C-terminal da MSP-3 apresentam limitados números de polimorfismos, enquanto o segmento gênico que codifica a região 6c da *Pfs48/45* é extremamente conservado nos isolados proveniente de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará, entretanto, os polimorfismos encontrados não impactaram significativamente nos epítomos de células T e B imunodominantes da GMZ2.6c.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sharp PM, Plenderleith LJ, Hahn BH. Ape Origins of Human Malaria. *Annual Review of Microbiology*. 2020;74(1): 39–63.
2. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*. 2012;5(1): 69.
3. van de Straat B, Russell TL, Staunton KM, Sinka ME, Burkot TR. A global assessment of surveillance methods for dominant malaria vectors. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 15337.
4. World Health Organization. *World Malaria Report*. 2022. <https://www.malariaworld.org/blogs/world-malaria-report-2022> [Acessado em 26 de dezembro de 2022].
5. Wangmo LD, Belo OMF, Penjor K, Drukpa T, do Rosario de Fatima Mota M, Viegas O da S, et al. Sustaining progress towards malaria elimination by 2025: Lessons from Bhutan & Timor-Leste. *The Lancet Regional Health West Pacific*. 2022;22: 100429.
6. Longley RJ, Grigg MJ, Schoffer K, Obadia T, Hyslop S, Piera KA, et al. *Plasmodium vivax* malaria serological exposure markers: Assessing the degree and implications of cross-reactivity with *P. knowlesi*. *Cell Reports Medicine*. 2022;3(6): 100662.
7. Saravu K, Rishikesh K, Kamath A, Shastry AB. Severity in *Plasmodium vivax* malaria claiming global vigilance and exploration – a tertiary care centre-based cohort study. *Malaria Journal*. 2014;13(1): 304.
8. Demissie Y, Ketema T. Complicated malaria symptoms associated with *Plasmodium vivax* among patients visiting health facilities in Mendi town, Northwest Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16(1): 436.
9. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016;95(6): 15–34.
10. Kumar R, Saravu K. Severe *vivax* malaria: a prospective exploration at a tertiary healthcare centre in Southwestern India. *Pathogens and Global Health*. 2017;111(3): 148–160.

11. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. *Boletim Epidemiológico*. 2022;53: 1–17.
12. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico da Malária 2021*. p. 1–100.
13. Pribluda VS, Evans L, Barillas E, Marmion J, Lukulay P, Chang J. Were medicine quality and pharmaceutical management contributing factors in diminishing artemisinin efficacy in Guyana and Suriname? *Malaria Journal*. 2014;13(1): 77.
14. Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, et al. Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. *eLife*. 2020;9: 1–21.
15. Acharya P, Garg M, Kumar P, Munjal A, Raja KD. Host–Parasite Interactions in Human Malaria: Clinical Implications of Basic Research. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8: 889.
16. Frischknecht F, Matuschewski K. *Plasmodium* Sporozoite Biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(5): a025478.
17. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends in Parasitology*. 2015;31(8): 357–362.
18. Graumans W, Jacobs E, Bousema T, Sinnis P. When Is a *Plasmodium*-Infected Mosquito an Infectious Mosquito? *Trends in Parasitology*. 2020;36(8): 705–716.
19. Mota MM, Hafalla JCR, Rodriguez A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nature medicine*. 2002;8(11): 1318–1322.
20. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell host & microbe*. 2008;3(2): 88–96.
21. Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(6): a025486.
22. Ancsin JB, Kisilevsky R. A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(21): 21824–21832.

23. Tewari R, Rathore D, Crisanti A. Motility and infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites expressing avian *Plasmodium gallinaceum* circumsporozoite protein. *Cellular Microbiology*. 2005;7(5): 699–707.
24. Mota MM, Giordano S, Rodriguez A. Targeting *Plasmodium* host cells: survival within hepatocytes. *Trends in molecular medicine*. 2004;10(10): 487–492.
25. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016;167(3): 610–624.
26. Flannery EL, Kangwanrangsang N, Chuenchob V, Roobsoong W, Fishbaugher M, Zhou K, et al. *Plasmodium vivax* latent liver infection is characterized by persistent hypnozoites, hypnozoite-derived schizonts, and time-dependent efficacy of primaquine. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*. 2022;26: 427–440.
27. Molina-Franky J, Patarroyo ME, Kalkum M, Patarroyo MA. The Cellular and Molecular Interaction Between Erythrocytes and *Plasmodium falciparum* Merozoites. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2022;12: 816574.
28. Weiss GE, Crabb BS, Gilson PR. Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. *Trends in Parasitology*. 2016;32(4): 284–295.
29. Tham WH, Healer J, Cowman AF. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*. 2012;28(1): 23–30.
30. Liffner B, Balbin JM, Wichers JS, Gilberger TW, Wilson DW. The Ins and Outs of *Plasmodium* Rhoptries, Focusing on the Cytosolic Side. *Trends in Parasitology*. 2021;37(7): 638–650.
31. 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.
32. Hale VL, Watermeyer JM, Hackett F, Vizcay-Barrena G, van Ooij C, Thomas JA, et al. Parasitophorous vacuole poration precedes its rupture and rapid host erythrocyte cytoskeleton collapse in *Plasmodium falciparum* egress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(13): 3439–3444.
33. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1): 17050.
34. Bancells C, Llorà-Batlle O, Poran A, Nötzl C, Rovira-Graells N, Elemento O, et al. Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature Microbiology*. 2018;4(1): 144–154.

35. Meibalan E, Marti M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(3): a025452.
36. Dash M, Sachdeva S, Bansal A, Sinha A. Gametogenesis in *Plasmodium*: Delving Deeper to Connect the Dots. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12: 1–15.
37. Saraiva RG, Kang S, Simões ML, Angleró-Rodríguez YI, Dimopoulos G. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Developmental & Comparative Immunology*. 2016;64: 53–64.
38. Jong RM, Tebeje SK, Meerstein-Kessel L, Tadesse FG, Jore MM, Stone W, et al. Immunity against sexual stage *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites. *Immunological Reviews*. 2020;293(1): 190–215.
39. Talman AM, Prieto JH, Marques S, Ubaida-Mohien C, Lawniczak M, Wass MN, et al. Proteomic analysis of the *Plasmodium* male gamete reveals the key role for glycolysis in flagellar motility. *Malaria Journal*. 2014;13(1): 315.
40. Carter LM, Pollitt LC, Wilson LG, Reece SE. Ecological influences on the behaviour and fertility of malaria parasites. *Malaria Journal*. 2016;15(1): 220.
41. Kumar N. Modulation of transmission success of *Plasmodium falciparum* gametocytes (sexual stages) in various species of Anopheles by erythrocytic asexual stage parasites. *Acta Tropica*. 2017;176: 263–269.
42. Demanga CG, Eng JWL, Gardiner DL, Roth A, Butterworth A, Adams JH, et al. The development of sexual stage malaria gametocytes in a Wave Bioreactor. *Parasites & Vectors*. 2017;10(1): 216.
43. Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. *Current opinion in microbiology*. 2009;12(4): 394–400.
44. García-Basteiro AL, Bassat Q, Alonso PL. Approaching the target: the path towards an effective malaria vaccine. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2012;4(1): e2012015.
45. Matuschewski K. Vaccines against malaria-still a long way to go. *The FEBS Journal*. 2017;284(16): 2560–2568.
46. Moormann AM, Nixon CE, Forconi CS. Immune effector mechanisms in malaria: An update focusing on human immunity. *Parasite immunology*. 2019;41(8): e12628.
47. Mandala WL, Harawa V, Dzinjalama F, Tembo D. The role of different components of the immune system against *Plasmodium falciparum* malaria:

- Possible contribution towards malaria vaccine development. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2021;246: 111425.
48. Deroost K, Pham TT, Opdenakker G, van den Steen PE. The immunological balance between host and parasite in malaria. van Ooij C (ed.) *FEMS Microbiology Reviews*. 2016;40(2): 208–257.
  49. Stevenson MM, Ing R, Berretta F, Miu J. Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: role of dendritic cells and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *International journal of biological sciences*. 2011;7(9): 1311–1322.
  50. Wong R, Bhattacharya D. Basics of memory B-cell responses: lessons from and for the real world. *Immunology*. 2019;156(2): 120–129.
  51. Hviid L, Barfod L, Fowkes FJI. Trying to remember: immunological B cell memory to malaria. *Trends in Parasitology*. 2015;31(3): 89–94.
  52. Silveira EL v, Dominguez MR, Soares IS. To B or Not to B: Understanding B Cell Responses in the Development of Malaria Infection. *Frontiers in immunology*. 2018;9: 2961.
  53. Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective Immunity produced by the Injection of X-irradiated Sporozoites of *Plasmodium berguei*. *Nature*. 1967;216(5111): 160–162.
  54. 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. *Bulletin of the World Health Organization*. 1979;57 (1): 165–173.
  55. Miller RM, Woodward WE, Clyde DF, McCarthy VC. Immunization of Man against *falciparum* and *vivax* Malaria by Use of Attenuated Sporozoites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1975;24(3): 397–401.
  56. Soares IF, López-Camacho C, Rodrigues-da-Silva RN, da Silva Matos A, de Oliveira Baptista B, Totino PRR, et al. Recombinant *Plasmodium vivax* circumsporozoite surface protein allelic variants: antibody recognition by individuals from three communities in the Brazilian Amazon. *Scientific Reports*. 2020;10(1): 14020.
  57. 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*. 2018;3: 159.

58. Long CA, Zavala F. Immune Responses in Malaria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(8): a025577.
59. Belachew EB. Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. *Journal of Immunology Research*. 2018;2018: 1–6.
60. Overstreet MG, Cockburn IA, Chen YC, Zavala F. Protective CD8 T cells against *Plasmodium* liver stages: immunobiology of an ‘unnatural’ immune response. *Immunological reviews*. 2008;225: 272–283.
61. Doolan DL, Hoffman SL. The Complexity of Protective Immunity Against Liver-Stage Malaria. *The Journal of Immunology*. 2000;165(3): 1453–1462.
62. Nlinwe ON, Kusi KA, Adu B, Sedegah M. T-cell responses against Malaria: Effect of parasite antigen diversity and relevance for vaccine development. *Vaccine*. 2018;36(17): 2237–2242.
63. 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. *The Journal of Immunology*. 2013;191(2): 785–794.
64. Teo A, Feng G, Brown G v., Beeson JG, Rogerson SJ. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. *Trends in Parasitology*. 2016;32(11): 887–898.
65. 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 Microbiology Reviews*. 2016;40(3): 343–372.
66. 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;344(6186): 871–877.
67. 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;
68. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvaray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;182(2): 409–418.
69. Joos C, Marrama L, Polson HEJ, Corre S, Diatta AM, Diouf B, et al. Clinical protection from *falciparum* malaria correlates with neutrophil respiratory bursts

- induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. *PloS one*. 2010;5(3): e9871.
70. Dick JK, Hart GT. Natural Killer Cell Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Activity Against *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells. *Methods in molecular biology*. 2022;2470: 641–657.
  71. Boyle MJ, Reiling L, Feng G, Langer C, Osier FH, Aspelting-Jones H, et al. Human Antibodies Fix Complement to Inhibit *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes and Are Associated with Protection against Malaria. *Immunity*. 2015;42(3): 580–590.
  72. Kurtovic L, Boyle MJ, Opi DH, Kennedy AT, Tham W, Reiling L, et al. Complement in malaria immunity and vaccines. *Immunological Reviews*. 2020;293(1): 38–56.
  73. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(12): 4168–4178.
  74. Dimbu PR, Horth R, Cândido ALM, Ferreira CM, Caquece F, Garcia LEA, et al. Continued Low Efficacy of Artemether-Lumefantrine in Angola in 2019. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021;65(2): e01949-20.
  75. Gansané A, Moriarty LF, Ménard D, Yerbanga I, Ouedraogo E, Sondo P, et al. Anti-malarial efficacy and resistance monitoring of artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine shows inadequate efficacy in children in Burkina Faso, 2017–2018. *Malaria Journal*. 2021;20(1): 48.
  76. Uwimana A, Umulisa N, Venkatesan M, Szigel SS, Zhou Z, Munyaneza T, et al. Association of *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H genotypes with delayed parasite clearance in Rwanda: an open-label, single-arm, multicentre, therapeutic efficacy study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2021;21(8): 1120–1128.
  77. Das S, Kar A, Manna S, Mandal S, Mandal S, Das S, et al. Artemisinin combination therapy fails even in the absence of *Plasmodium falciparum* kelch13 gene polymorphism in Central India. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 9946.
  78. Hancock PA, Hendriks CJM, Tangena JA, Gibson H, Hemingway J, Coleman M, et al. Mapping trends in insecticide resistance phenotypes in African malaria vectors. *PLOS Biology*. 2020;18(6): e3000633.

79. Laurens MB. The Promise of a Malaria Vaccine—Are We Closer? *Annual Review of Microbiology*. 2018;72(1): 273–292.
80. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. *American Journal of Preventive Medicine*. 2015;49(6): 319–333.
81. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria. *Nature*. 1961;192(4804): 733–737.
82. McGregor IA. The Passive Transfer of Human Malarial Immunity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1964;13: 237–239.
83. Thera MA, Plowe C v. Vaccines for Malaria: How Close Are We? *Annual Review of Medicine*. 2012;63(1): 345–357.
84. Risco-Castillo V, Topçu S, Marinach C, Manzoni G, Bigorgne AE, Briquet S, et al. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell Host & Microbe*. 2015;18(5): 593–603.
85. Kebaier C, Voza T, Vanderberg J. Kinetics of mosquito-injected *Plasmodium* sporozoites in mice: fewer sporozoites are injected into sporozoite-immunized mice. *PLoS pathogens*. 2009;5(4): e1000399.
86. Chattopadhyay R, Kumar S. Malaria vaccine: latest update and challenges ahead. *Indian journal of experimental biology*. 2009;47(7): 527–536.
87. Bonam SR, Rénia L, Tadepalli G, Bayry J, Kumar HMS. *Plasmodium falciparum* Malaria Vaccines and Vaccine Adjuvants. *Vaccines*. 2021;9(10): 1072.
88. Pirahmadi S, Afzali S, Zargar M, Zakeri S, Mehrizi AA. How can we develop an effective subunit vaccine to achieve successful malaria eradication? *Microbial Pathogenesis*. 2021;160: 105203.
89. Frimpong A, Kusi KA, Ofori MF, Ndifon W. Novel Strategies for Malaria Vaccine Design. *Frontiers in immunology*. 2018;9: 2769.
90. World Health Organization. *WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk*. 2021. <https://www.who.int/news/item/06-10-2021> [Acessado em 20 de outubro de 2021].
91. Ouattara A, Laurens MB. Vaccines Against Malaria. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60(6): 930–936.
92. Syed YY. RTS,S/AS01 malaria vaccine (Mosquirix®): a profile of its use. *Drugs & Therapy Perspectives*. 2022;38(9): 373–381.
93. Dattoo MS, Natama MH, Somé A, Traoré O, Rouamba T, Bellamy D, et al. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M,



- with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2021;397(10287): 1809–1818.
94. Payne RO, Silk SE, Elias SC, Milne KH, Rawlinson TA, Llewellyn D, et al. Human vaccination against Plasmodium vivax Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. *JCI Insight*. 2017;2(12).
  95. Lee SM, Wu Y, Hickey JM, Miura K, Whitaker N, Joshi SB, et al. The Pfs230 N-terminal fragment, Pfs230D1+: expression and characterization of a potential malaria transmission-blocking vaccine candidate. *Malaria Journal*. 2019;18(1).
  96. Healy SA, Anderson C, Swihart BJ, Mwakingwe A, Gabriel EE, Decederfelt H, et al. Pfs230 yields higher malaria transmission-blocking vaccine activity than Pfs25 in humans but not mice. *The Journal of clinical investigation*. 2021;131(7): e146221.
  97. Minassian AM, Silk SE, Barrett JR, Nielsen CM, Miura K, Diouf A, et al. Reduced blood-stage malaria growth and immune correlates in humans following RH5 vaccination. *Med*. 2021;2(6): 701.
  98. Theisen M, Jore MM, Sauerwein R. Towards clinical development of a Pfs48/45-based transmission blocking malaria vaccine. *Expert Review of Vaccines*. 2017;16(4): 329–336.
  99. 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;27(49): 6862–6868.
  100. 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): 6698–6703.
  101. Bélard 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): e22525.
  102. 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. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013;208(3): 479–488.
  103. 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): 4536–4542.

104. 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. *Malaria Journal*. 2013;12(1): 51.
105. Dassah S, Adu B, Sirima SB, Mordmüller B, Ngoa UA, Atuguba F, et al. Extended follow-up of children in a phase 2b trial of the GMZ2 malaria vaccine. *Vaccine*. 2021;39(31): 4314–4319.
106. Dassah S, Adu B, Tiendrebeogo RW, Singh SK, Arthur FKN, Sirima SB, et al. GMZ2 Vaccine-Induced Antibody Responses, Naturally Acquired Immunity and the Incidence of Malaria in Burkinabe Children. *Frontiers in immunology*. 2022;13.
107. Theisen M, Adu B, Mordmüller B, Singh S. The GMZ2 malaria vaccine: from concept to efficacy in humans. *Expert Review of Vaccines*. 2017;16(9): 907–917.
108. 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;34(19): 2207–2215.
109. Baptista BO, de Souza ABL, Riccio EKP, Bianco-Junior C, Totino PRR, Martins da Silva JH, 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(1): 6.
110. Graves PM, Carters R, Burkot TR, Quakyi IA, Kumar N. Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunology*. 1988;10(2): 209–218.
111. Ong CSL, Zhang KY, Eida SJ, Graves PM, Dow C, Looker M, et al. The primary antibody response of malaria patients to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens which are potential transmission blocking vaccine candidates. *Parasite Immunology*. 1990;12(4–5): 447–456.
112. Roeffen W, Mulder B, Teelen K, Bolmer M, Eling W, Targett GAT, et al. Association between anti-Pfs48/45 reactivity and *P. falciparum* transmission-blocking activity in sera from Cameroon. *Parasite Immunology*. 1996;18(2): 103–109.

113. 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. *Infection and Immunity*. 2000;68(5): 2617–2620.
114. Theisen M, Soe S, Jessing SG, Okkels LM, Danielsen S, Oeuvray C, et al. Identification of a major B-cell epitope of the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing. *Vaccine*. 2000;19(2–3): 204–212.
115. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;74(3): 425–431.
116. 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 immunology*. 2006;28(5): 185–190.
117. Pratt-Riccio LR, Bianco-Junior C, Totino PRR, Perce-Da-Silva DDS, 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(suppl 1): 34–43.
118. Baumann A, Magris MM, Urbaez ML, 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. *Malaria Journal*. 2012;11(1): 46.
119. 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 immunology*. 2007;29(6): 309–317.
120. Pratt-Riccio LR, Lima-Junior 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;73(6): 1096–1103.
121. Oeuvray C, 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 *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood*. 1994;84(5): 1594–1602.
122. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Iepers JP, Ralamboranto L, Tartar A, et al. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1994;89(suppl 2): 77–80.
  123. Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, Danielsen S, et al. The Glutamate-Rich Protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* Is a Target for Antibody-Dependent Monocyte-Mediated Inhibition of Parasite Growth *In Vitro*. *Infection and Immunity*. 1998;66(1): 11–17.
  124. Borre MB, Dziegiel M, Høgh B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, et al. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* Glutamate Rich Protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1991;49(1): 119–131.
  125. Vuust J, Høgh B, Petersen E, Jepsen S, Borre MB, Dziegiel M. Recombinant *Plasmodium falciparum* Glutamate Rich Protein; Purification and use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;44(3): 306–313.
  126. Pattaradilokrat S, Trakoolsoontorn C, Simpalipan P, Warrit N, Kaewthamasorn M, Harnyuttanakorn P. Size and sequence polymorphisms in the glutamate-rich protein gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in Thailand. *Parasites & vectors*. 2018;11(1): 49.
  127. Quintana M del P, Ch'ng JH, Zandian A, Imam M, Hultenby K, Theisen M, et al. SURGE complex of *Plasmodium falciparum* in the rhoptry-neck (SURFIN4.2- RON4-GLURP) contributes to merozoite invasion. *PLOS ONE*. 2018;13(8): e0201669.
  128. Theisen M, Cox G, Høgh B, Jepsen S, Vuust J. Immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* Glutamate-Rich Protein expressed by vaccinia virus. *Infection and Immunity*. 1994;62(8): 3270–3275.
  129. Duru KC, Thomas BN. Genetic Diversity and Allelic Frequency of Glutamate-Rich Protein (GLURP) in *Plasmodium falciparum* Isolates from Sub-Saharan Africa. *Microbiology insights*. 2014;7: 35–39.

130. Kumar D, Dhiman S, Rabha B, Goswami D, Deka M, Singh L, et al. Genetic polymorphism and amino acid sequence variation in *Plasmodium falciparum* GLURP R2 repeat region in Assam, India, at an interval of five years. *Malaria Journal*. 2014;13(1): 450.
131. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, et al. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malaria Journal*. 2011;10(1): 79.
132. Nguetse CN, Ojo JA, Nchotebah C, Ikegbunam MN, Meyer CG, Thomas BN, et al. Genetic Diversity of the *Plasmodium falciparum* Glutamate-Rich Protein R2 Region Before and Twelve Years after Introduction of Artemisinin Combination Therapies among Febrile Children in Nigeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018;98(3): 667–676.
133. Pratt-Riccio LR, Perce-da-Silva D de S, Lima-Junior J da C, Theisen M, Santos F, Daniel-Ribeiro CT, et al. Genetic polymorphisms in the glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* field isolates from a malaria-endemic area of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(4): 523–528.
134. Kana IH, Adu B, Tiendrebeogo RW, Singh SK, Doodoo D, Theisen M. Naturally Acquired Antibodies Target the Glutamate-Rich Protein on Intact Merozoites and Predict Protection Against Febrile Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2017;215(4): 623–630.
135. Dziegiel M, Rowe P, Bennett S, Allen SJ, Olerup O, Gottschau A, et al. Immunoglobulin M and G antibody responses to *Plasmodium falciparum* Glutamate-Rich Protein: correlation with clinical immunity in Gambian children. *Infection and Immunity*. 1993;61(1): 103–108.
136. Jepsen S, Holm A, Hogh B, Hanson A, Vuust J, Petersen E, et al. Antibodies to a Recombinant Glutamate-Rich *Plasmodium falciparum* Protein: Evidence for Protection of Individuals Living in a Holoendemic Area of Liberia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;46(3): 307–313.
137. Meraldi V, Nebie I, Tiono AB, Diallo D, Sanogo E, Theisen M, et al. Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* Exp-1, MSP-3 and GLURP long synthetic peptides and association with protection. *Parasite Immunology*. 2004;26(6–7): 265–272.
138. Hermsen CC, Verhage DF, Telgt DSC, Teelen K, Bousema JT, Roestenberg M, et al. Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit *in vitro*

- growth of *Plasmodium falciparum* in a phase 1 malaria vaccine trial. *Vaccine*. 2007;25(15): 2930–2940.
139. Dodo D, Theisen M, Kurtzhals JAL, Akanmori BD, Koram KA, Jepsen S, et al. Naturally Acquired Antibodies to the Glutamate-Rich Protein Are Associated with Protection against *Plasmodium falciparum* Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(3): 1202–1205.
  140. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye KS, Druilhe P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to Merozoite Surface Protein 3 and the 220-kilodalton Glutamate-Rich Protein. *Infection and immunity*. 2004;72(1): 247–252.
  141. 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. *Malaria journal*. 2005;4: 48.
  142. Theisen M, Vuust J, Gottschau A, Jepsen S, Høgh B. Antigenicity and immunogenicity of recombinant Glutamate-Rich Protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 1995;2(1): 30–34.
  143. McColl DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-3 (MSP-3). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997;90(1): 21–31.
  144. Imam M, Singh S, Kaushik NK, Chauhan VS. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3: oligomerization, self-assembly, and heme complex formation. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(7): 3856–3868.
  145. Huber W, Felger I, Matile H, Joachim Lipps H, Steiger S, Beck HP. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 3. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997;87(2): 231–234.
  146. Polley SD, Tetteh KKA, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA, et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(2): 279–287.
  147. Sawaswong V, Simpailpan P, Siripoon N, Harnyuttanakorn P, Pattaradilokrat S. Allelic Diversity and Geographical Distribution of the Gene Encoding

- Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-3 in Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*. 2015;53(2): 177–187.
148. Pattaradilokrat S, Sawaswong V, Simpailpan P, Kaewthamasorn M, Siripoon N, Harnyuttanakorn P. Genetic diversity of the merozoite surface protein-3 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Malaria Journal*. 2016;15(1): 517.
  149. Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, Corradin G, et al. Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infection and immunity*. 2005;73(12): 8017–8026.
  150. Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, et al. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS medicine*. 2005;2(11): e344.
  151. Singh SK, Thrane S, Chourasia BK, Teelen K, Graumans W, Stoter R, et al. Pfs230 and Pfs48/45 Fusion Proteins Elicit Strong Transmission-Blocking Antibody Responses Against *Plasmodium falciparum*. *Frontiers in immunology*. 2019;10: 1256.
  152. Outchkourov NS, Roeffen W, Kaan A, Jansen J, Luty A, Schuiffel D, et al. Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(11): 4301–4305.
  153. Chowdhury DR, Angov E, Kariuki T, Kumar N. A potent malaria transmission blocking vaccine based on codon harmonized full length Pfs48/45 expressed in *Escherichia coli*. *PloS one*. 2009;4(7): e6352.
  154. Arredondo SA, Kappe SHI. The s48/45 six-cysteine proteins: mediators of interaction throughout the *Plasmodium* life cycle. *International Journal for Parasitology*. 2017;47(7): 409–423.
  155. Outchkourov N, Vermunt A, Jansen J, Kaan A, Roeffen W, Teelen K, et al. Epitope analysis of the malaria surface antigen Pfs48/45 identifies a subdomain that elicits transmission blocking antibodies. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(23): 17148–17156.
  156. Ochwedo KO, Ariri FO, Otambo WO, Magomere EO, Debrah I, Onyango SA, et al. Rare Alleles and Signatures of Selection on the Immunodominant Domains of Pfs230 and Pfs48/45 in Malaria Parasites From Western Kenya. *Frontiers in genetics*. 2022;13: 867906.

157. Jones S, Grignard L, Nebie I, Chilongola J, Dodoo D, Sauerwein R, et al. Naturally acquired antibody responses to recombinant Pfs230 and Pfs48/45 transmission blocking vaccine candidates. *Journal of Infection*. 2015;71(1): 117–127.
158. Kundu P, Semesi A, Jore MM, Morin MJ, Price VL, Liang A, et al. Structural delineation of potent transmission-blocking epitope I on malaria antigen Pfs48/45. *Nature Communications*. 2018;9(1): 4458.
159. Ouédraogo AL, Roeffen W, Luty AJF, de Vlas SJ, Nebie I, Ilboudo-Sanogo E, et al. Naturally Acquired Immune Responses to *Plasmodium falciparum* Sexual Stage Antigens Pfs48/45 and Pfs230 in an Area of Seasonal Transmission. *Infection and Immunity*. 2011;79(12): 4957–4964.
160. Trager W, Jensen JB. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science*. 1976;193(4254): 673–675. <https://doi.org/10.1126/science.781840>.
161. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of parasitology*. 1979;65(3): 418–420.
162. Hill DL, Eriksson EM, Schofield L. High yield purification of *Plasmodium falciparum* merozoites for use in opsonizing antibody assays. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;(89): 51590.
163. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic acids research*. 2008;36: W509-12.
164. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2003;12(5): 1007–1017.
165. Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC bioinformatics*. 2005;6: 132.
166. Sidney J, Assarsson E, Moore C, Ngo S, Pinilla C, Sette A, et al. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immune research*. 2008;4(1): 2.



167. Anthony TG, Polley SD, Vogler AP, Conway DJ. Evidence of non-neutral polymorphism in *Plasmodium falciparum* gamete surface protein genes Pfs47 and Pfs48/45. *Molecular and biochemical parasitology*. 2007;156(2): 117–123.
168. Roussilhon C, Oeuvray C, Müller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape JF, et al. Long-term clinical protection from *falciparum* malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS medicine*. 2007;4(11): e320.
169. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*. 2017;34(12): 3299–3302.
170. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3): 585–595.
171. Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, Pei J, et al. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins*. 2009;77(9): 89–99.
172. Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic acids research*. 2004;32: W526-31.
173. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*. 2018;27(1): 293–315.
174. Dejon-Agobe JC, Ateba-Ngoa U, Lalremruata A, Homoet A, Engelhorn J, Nouatin OP, et al. Controlled Human Malaria Infection of Healthy Adults With Lifelong Malaria Exposure to Assess Safety, Immunogenicity, and Efficacy of the Asexual Blood Stage Malaria Vaccine Candidate GMZ2. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;69(8): 1377–1384.
175. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunology*. 2011;12(6): 492–499.
176. Weiss GE, Clark EH, Li S, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, et al. A Positive Correlation between Atypical Memory B Cells and *Plasmodium falciparum* Transmission Intensity in Cross-Sectional Studies in Peru and Mali. *PLoS ONE*. 2011;6(1): e15983.
177. Shankar EM, Vignesh R, Dash AP. Recent advances on T-cell exhaustion in malaria infection. *Medical Microbiology and Immunology*. 2018;207(3–4): 167–174.

178. Holla P, Ambegaonkar A, Sohn H, Pierce SK. Exhaustion may not be in the human B cell vocabulary, at least not in malaria. *Immunological Reviews*. 2019;292(1): 139–148.
179. Weiss GE, Crompton PD, Li S, Walsh LA, Moir S, Traore B, et al. Atypical Memory B Cells Are Greatly Expanded in Individuals Living in a Malaria-Endemic Area. *The Journal of Immunology*. 2009;183(3): 2176–2182.
180. Illingworth J, Butler NS, Roetyncck S, Mwacharo J, Pierce SK, Bejon P, et al. Chronic Exposure to *Plasmodium falciparum* Is Associated with Phenotypic Evidence of B and T Cell Exhaustion. *The Journal of Immunology*. 2013;190(3): 1038–1047.
181. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtabe D, et al. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS pathogens*. 2010;6(5): e1000912.
182. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, et al. Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infection and immunity*. 2008;76(2): 759–766.
183. Courtin D, Oesterholt M, Huismans 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;4(10): e7590.
184. Acquah FK, Obboh EK, Asare K, Boampong JN, Nuvor SV, Singh SK, et al. Antibody responses to two new *Lactococcus lactis*-produced recombinant Pfs48/45 and Pfs230 proteins increase with age in malaria patients living in the Central Region of Ghana. *Malaria Journal*. 2017;16(1): 306.
185. Dobaño C, Santano R, Vidal M, Jiménez A, Jairoce C, Ubillos I, et al. Differential Patterns of IgG Subclass Responses to *Plasmodium falciparum* Antigens in Relation to Malaria Protection and RTS,S Vaccination. *Frontiers in immunology*. 2019;10: 439.
186. Lima-Junior J da C, Pratt-Riccio LR. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. *Frontiers in Immunology*. 2016;7: 13.

187. Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Daniel Ribeiro CT, Goldberg AC, et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta tropica*. 2004;92(1): 63–69.
188. Pratt-Riccio LR, de Souza Perce-Da-Silva D, da Costa Lima-Junior J, Pratt Riccio EK, Ribeiro-Alves M, Santos F, et al. Synthetic Antigens Derived from *Plasmodium falciparum* Sporozoite, Liver, and Blood Stages: Naturally Acquired Immune Response and Human Leukocyte Antigen Associations in Individuals Living in a Brazilian Endemic Area. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017;97(5): 1581–1592.
189. 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 Immunology*. 2003;25(6): 307–312.
190. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. Antibodies in *falciparum* malaria: what matters most, quantity or quality? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1992;87(3): 229–234.
191. Ortega E, Soto-Cruz I. Early biochemical events in leukocyte activation through receptors for IgG. *Signal Transduction*. 2007;7(5–6): 415–426.
192. Druilhe P, Pérignon JL. Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans. *Immunology Letters*. 1994;41(2–3): 115–120.
193. Scopel KKG, Fontes CJF, Ferreira MU, Braga EM. Factors associated with immunoglobulin G subclass polarization in naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins: a cross-sectional survey in Brazilian Amazonia. *Clinical and vaccine immunology*. 2006;13(7): 810–813.
194. Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SLR, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WMM, et al. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infection and immunity*. 2006;74(1): 257–264.
195. Aucan C, Traoré Y, Fumoux F, Rihet P. Familial Correlation of Immunoglobulin G Subclass Responses to *Plasmodium falciparum* Antigens in Burkina Faso. *Infection and Immunity*. 2001;69(2): 996–1001.
196. Coffman RL, Leberman DA, Rothman P. Mechanism and Regulation of Immunoglobulin Isotype Switching. *Advances in immunology*. 1993, p. 229–270.

197. Isakson PC, Puré E, Vitetta ES, Krammer PH. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1982;155(3): 734–748.
198. Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Current Opinion in Immunology*. 1996;8(2): 199–205.
199. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annual review of immunology*. 2002;20: 165–196.
200. 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. *Journal of Infectious Diseases*. 1996;173(3): 765–768.
201. Oloo AJ, Lal AA, Bloland PB, Hawley WA, Udhayakumar V, Hightower AW, 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;58(2): 211–219.
202. Fialho RR, Gras-Masse H, Daniel-Ribeiro CT, Banic DM, de Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, et al. Immune response and lack of immune response to *Plasmodium falciparum* P126 antigen and its amino-terminal repeat in malaria-infected humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;58(6): 768–774.
203. 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. *Infection and immunity*. 2008;76(5): 2240–2248.
204. 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. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(4): 519–526.
205. 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? *Tropical medicine & international health*. 2008;13(2): 229–237.

206. Carvalho LJM, Alves FA, Bianco C, Oliveira SG, Zanini GM, Soe S, et al. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2005;12(2): 242–248.
207. Ambrosino E, Dumoulin C, Orlandi-Pradines E, Remoue F, Toure-Baldé A, Tall A, et al. A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. *Malaria journal*. 2010;9(1): 317.
208. Theisen M, Soe S, Jessing SG, Okkels LM, Danielsen S, Oeuvray C, et al. Identification of a major B-cell epitope of the *Plasmodium falciparum* Glutamate-Rich Protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing. *Vaccine*. 2000;19(2–3): 204–212.
209. Singh S, Soe S, Mejia JP, Roussilhon C, Theisen M, Corradin G, et al. Identification of a conserved region of *Plasmodium falciparum* MSP3 targeted by biologically active antibodies to improve vaccine design. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(5): 1010–1018.
210. Theisen M, Doodoo D, Toure-Balde A, Soe S, Corradin G, Koram KK, et al. Selection of Glutamate-Rich Protein Long Synthetic Peptides for Vaccine Development: Antigenicity and Relationship with Clinical Protection and Immunogenicity. *Infection and Immunity*. 2001;69(9): 5223–5229.
211. Tangye SG, Ferguson A, Avery DT, Ma CS, Hodgkin PD. Isotype Switching by Human B Cells Is Division-Associated and Regulated by Cytokines. *The Journal of Immunology*. 2002;169(8): 4298–4306.
212. Cassiano GC, Furini AAC, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Cunha MG, Kano FS, et al. Polymorphisms in B Cell Co-Stimulatory Genes Are Associated with IgG Antibody Responses against Blood-Stage Proteins of *Plasmodium vivax*. *PLOS ONE*. 2016;11(2): e0149581.
213. Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Journal of immunology research*. 2017;2017: 2680160.
214. Singh SK, Plieskatt J, Chourasia BK, Fabra-García A, Garcia-Senosian A, Singh V, et al. A Reproducible and Scalable Process for Manufacturing a

- Pfs48/45 Based *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine. *Frontiers in Immunology*. 2021;11: 606266.
215. Lee SM, Hickey JM, Miura K, Joshi SB, Volkin DB, King CR, et al. A C-terminal Pfs48/45 malaria transmission-blocking vaccine candidate produced in the baculovirus expression system. *Scientific Reports*. 2020;10(1): 395.
  216. Lennartz F, Brod F, Dabbs R, Miura K, Mekhaïel D, Marini A, et al. Structural basis for recognition of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 by a transmission blocking antibody. *Nature Communications*. 2018;9(1): 3822.
  217. Stone WJR, Campo JJ, Ouédraogo AL, Meerstein-Kessel L, Morlais I, Da D, et al. Unravelling the immune signature of *Plasmodium falciparum* transmission-reducing immunity. *Nature Communications*. 2018;9(1): 558.
  218. Ouédraogo AL, Eckhoff PA, Luty AJF, Roeffen W, Sauerwein RW, Bousema T, et al. Modeling the impact of *Plasmodium falciparum* sexual stage immunity on the composition and dynamics of the human infectious reservoir for malaria in natural settings. *PLOS Pathogens*. 2018;14(5): e1007034.
  219. Ayanful-Torgby R, Sarpong E, Abagna HB, Donu D, Obboh E, Mensah BA, et al. Persistent *Plasmodium falciparum* infections enhance transmission-reducing immunity development. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 21380.
  220. Baldé AT, Sarthou JL, Roussilhon C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunology Letters*. 1995;46(1–2): 59–62.
  221. Balde AT, Aribot G, Tall A, Spiegel A, Roussilhon C. Apoptosis modulation in mononuclear cells recovered from individuals exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Parasite Immunology*. 2000;22(6): 307–318.
  222. Toure-Balde A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, et al. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infection and Immunity*. 1996;64(3): 744–750.
  223. Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, Gombert W, Bofill M, Shamsadeen N, et al. The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *Journal of Experimental Medicine*. 1993;178(2): 427–438.
  224. Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, Tetsutani K, et al. Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. *European journal of immunology*. 2010;40(4): 1053–1061.

225. Brake DA, Long CA, Weidanz WP. Adoptive protection against *Plasmodium chabaudi* adami malaria in athymic nude mice by a cloned T cell line. *The Journal of Immunology*. 1988;140(6): 1989–1993.
226. Waki S, Uehara S, Kanbe K, Ono K, Suzuki M, Nariuchi H. The role of T cells in pathogenesis and protective immunity to murine malaria. *Immunology*. 1992;75(4): 646–651.
227. Imai T, Ishida H, Suzue K, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, et al. Cytotoxic activities of CD8+ T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. *eLife*. 2015;4(4): 1–49.
228. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *The Lancet*. 2002;360(9333): 610–617.
229. Kumar R, Loughland JR, Ng SS, Boyle MJ, Engwerda CR. The regulation of CD4 + T cells during malaria. *Immunological Reviews*. 2020;293(1): 70–87.
230. Kurup SP, Butler NS, Harty JT. T cell-mediated immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*. 2019;19(7): 457–471.
231. Nouatin O, Ibáñez J, Fendel R, Ngoa UA, Lorenz FR, Dejon-Agobé JC, et al. Cellular and antibody response in GMZ2-vaccinated Gabonese volunteers in a controlled human malaria infection trial. *Malaria Journal*. 2022;21(1): 191.
232. Millington OR, di Lorenzo C, Phillips RS, Garside P, Brewer JM. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during *Plasmodium* infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *Journal of biology*. 2006;5(2): 5.
233. Doolan DL, Hoffman SL, Southwood S, Wentworth PA, Sidney J, Chesnut RW, et al. Degenerate Cytotoxic T Cell Epitopes from *P. falciparum* Restricted by Multiple HLA-A and HLA-B Supertype Alleles. *Immunity*. 1997;7(1): 97–112.
234. Lalvani A, Hurt N, Aidoo M, Kibatala P, Tanner M, Hill AVS. Cytotoxic T lymphocytes to *Plasmodium falciparum* epitopes in an area of intense and perennial transmission in Tanzania. *European Journal of Immunology*. 1996;26(4): 773–779.
235. Kusi KA, Aggor FE, Amoah LE, Anum D, Nartey Y, Amoako-Sakyi D, et al. Identification of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-specific CD8+ T cell epitopes in a malaria exposed population. *PloS one*. 2020;15(2): e0228177.

236. Doolan DL, Southwood S, Freilich DA, Sidney J, Graber NL, Shatney L, et al. Identification of *Plasmodium falciparum* antigens by antigenic analysis of genomic and proteomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(17): 9952–9957.
237. Ewer KJ, O'Hara GA, Duncan CJA, Collins KA, Sheehy SH, Reyes-Sandoval A, et al. Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nature Communications*. 2013;4(1): 2836.
238. Sun P, Schwenk R, White K, Stoute JA, Cohen J, Ballou WR, et al. Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein-specific CD4+ and CD8+ T cells producing IFN-gamma. *Journal of immunology*. 2003;171(12): 6961–6967.
239. Chandele A, Mukerjee P, Das G, Ahmed R, Chauhan VS. Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. *Immunology*. 2011;132(2): 273–286.
240. Lundie RJ, de Koning-Ward TF, Davey GM, Nie CQ, Hansen DS, Lau LS, et al. Blood-stage *Plasmodium* infection induces CD8+ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 alpha+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(38): 14509–14514.
241. Junqueira C, Barbosa CRR, Costa PAC, Teixeira-Carvalho A, Castro G, Sen Santana S, et al. Cytotoxic CD8+ T cells recognize and kill *Plasmodium vivax*-infected reticulocytes. *Nature Medicine*. 2018;24(9): 1330–1336.
242. Burel JG, Apte SH, McCarthy JS, Doolan DL. *Plasmodium vivax* but Not *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Infection in Humans Is Associated with the Expansion of a CD8+ T Cell Population with Cytotoxic Potential. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(12): e0005031.
243. Li T, Steede NK, Nguyen HNP, Freytag LC, McLachlan JB, Mettu RR, et al. Comprehensive analysis of contributions from protein conformational stability and major histocompatibility complex class II-peptide binding affinity to CD4+ epitope immunogenicity in HIV-1 envelope glycoprotein. *Journal of virology*. 2014;88(17): 9605–9615.
244. Hensmann M, Li C, Moss C, Lindo V, Greer F, Watts C, et al. Disulfide bonds in merozoite surface protein 1 of the malaria parasite impede efficient antigen



- processing and affect the *in vivo* antibody response. *European journal of immunology*. 2004;34(3): 639–648.
245. Zhu H, Liu K, Cerny J, Imoto T, Moudgil KD. Insertion of the dibasic motif in the flanking region of a cryptic self-determinant leads to activation of the epitope-specific T cells. *Journal of immunology*. 2005;175(4): 2252–2260.
246. Antoniou AN, Blackwood SL, Mazzeo D, Watts C. Control of Antigen Presentation by a Single Protease Cleavage Site. *Immunity*. 2000;12(4): 391–398.
247. Yap XZ, Hustin LSP, Sauerwein RW. TH1-Polarized TFH Cells Delay Naturally-Acquired Immunity to Malaria. *Frontiers in immunology*. 2019;10: 1096.
248. Asito AS, Moormann AM, Kiprotich C, Ng'ang'a ZW, Ploutz-Snyder R, Rochford R. Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. *Malaria journal*. 2008;7: 238.
249. Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. *Clinical and vaccine immunology*. 2006;13(3): 376–379.
250. Portugal S, Tipton CM, Sohn H, Kone Y, Wang J, Li S, et al. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *eLife*. 2015;4: e07218.
251. Jahnmatz P, Sundling C, Yman V, Widman L, Asghar M, Sondén K, et al. Memory B-Cell Responses Against Merozoite Antigens After Acute *Plasmodium falciparum* Malaria, Assessed Over One Year Using a Novel Multiplexed FluoroSpot Assay. *Frontiers in immunology*. 2020;11: 619398.
252. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunological reviews*. 2003;193(1): 70–81.
253. Donjerkovic D, Scott DW. Activation-induced cell death in B lymphocytes. *Cell Research*. 2000;10(3): 179–192.
254. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature Immunology*. 2012;13(2): 188–195.

255. Horne-Debets JM, Faleiro R, Karunarathne DS, Liu XQ, Lineburg KE, Poh CM, et al. PD-1 Dependent Exhaustion of CD8+ T Cells Drives Chronic Malaria. *Cell Reports*. 2013;5(5): 1204–1213.
256. Abel A, Steeg C, Aminkiah F, Addai-Mensah O, Addo M, Gagliani N, et al. Differential expression pattern of co-inhibitory molecules on CD4+ T cells in uncomplicated versus complicated malaria. *Scientific Reports*. 2018;8(1): 4789.
257. Gbedande K, Carpio VH, Stephens R. Using two phases of the CD4 T cell response to blood-stage murine malaria to understand regulation of systemic immunity and placental pathology in *Plasmodium falciparum* infection. *Immunological Reviews*. 2020;293(1): 88–114.
258. Opata MM, Stephens R. Chronic *Plasmodium chabaudi* Infection Generates CD4 Memory T Cells with Increased T Cell Receptor Sensitivity but Poor Secondary Expansion and Increased Apoptosis. *Infection and Immunity*. 2017;85(3): e00744-16.
259. Riccio EKP, Júnior IN, Riccio LRP, das Graças Alecrim M, Corte-Real S, Morgado M, et al. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitology research*. 2003;90(1): 9–18.
260. Hojo-Souza NS, Pereira DB, Passos LSA, Gazzinelli-Guimarães PH, Cardoso MS, Tada MS, et al. Phenotypic profiling of CD8+ T cells during *Plasmodium vivax* blood-stage infection. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1): 35.
261. Chelimo K, Embury PB, Odada Sumba P, Vulule J, Ofulla A v., Long C, et al. Age-Related Differences in Naturally Acquired T Cell Memory to *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1. *PLoS ONE*. 2011;6(9): e24852.
262. Jagannathan P, Bowen K, Nankya F, McIntyre TI, Auma A, Wamala S, et al. Effective Antimalarial Chemoprevention in Childhood Enhances the Quality of CD4 + T Cells and Limits Their Production of Immunoregulatory Interleukin 10. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;214(2): 329–338.
263. Heide J, Wildner NH, Ackermann C, Wittner M, Marget M, Sette A, et al. Detection of EXP1-Specific CD4+ T Cell Responses Directed Against a Broad Range of Epitopes Including Two Promiscuous MHC Class II Binders During Acute *Plasmodium falciparum* Malaria. *Frontiers in immunology*. 2019;10: 3037.

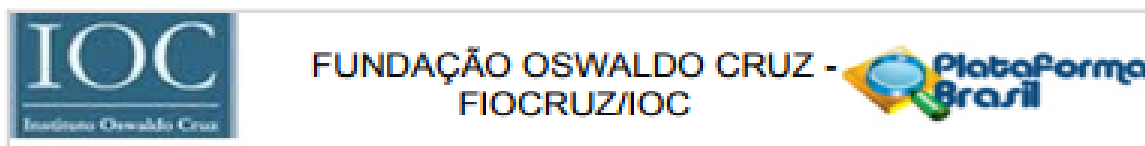
264. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American journal of human genetics*. 2005;77(2): 171–192.
265. Lima-Junior JC, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Jiang J, Singh B, Fabrício-Silva GM, et al. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3 $\alpha$  and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. *PLoS one*. 2012;7(5): e36419.
266. Ganeshan H, Kusi KA, Anum D, Hollingdale MR, Peters B, Kim Y, et al. Measurement of *ex vivo* ELISpot interferon-gamma recall responses to *Plasmodium falciparum* AMA1 and CSP in Ghanaian adults with natural exposure to malaria. *Malaria Journal*. 2016;15(1): 55.
267. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Tiono AB, Konate AT, Gansane A, et al. Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso. *Parasite immunology*. 2009;31(8): 474–480.
268. Podoba JE, Stevenson MM. CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infection and Immunity*. 1991;59(1): 51–58. <https://doi.org/10.1128/iai.59.1.51-58.1991>.
269. Wang K, Li H, Xu Y, Shao Q, Yi J, Wang R, et al. MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(1): 610–613.
270. Escalante AA, Lal AA, Ayala FJ. Genetic Polymorphism and Natural Selection in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics*. 1998;149(1): 189–202.
271. Ajibola O, Diop MF, Ghansah A, Amenga-Etego L, Golassa L, Apinjoh T, et al. *In silico* characterisation of putative *Plasmodium falciparum* vaccine candidates in African malaria populations. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 16215.
272. Stricker K de, Vuust J, Jepsen S, Oeuvray C, Theisen M. Conservation and heterogeneity of the Glutamate-Rich Protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000;111(1): 123–130.
273. Lê HG, Thái TL, Kang JM, Lee J, Moe M, Võ TC, et al. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-3 in Myanmar *Plasmodium falciparum* field isolates. *Malaria Journal*. 2020;19(1): 184.
274. Gondeau C, Corradin G, Heitz F, le Peuch C, Balbo A, Schuck P, et al. The C-terminal domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 self-

- assembles into alpha-helical coiled coil tetramer. *Molecular and biochemical parasitology*. 2009;165(2): 153–161.
275. Rodríguez LE, Curtidor H, Ocampo M, Garcia J, Puentes A, Valbuena J, et al. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2005;14(7): 1778–1786.
276. Conway DJ, Machado RL, Singh B, Dessert P, Mikes ZS, Pova MM, et al. Extreme geographical fixation of variation in the Extreme geographical fixation of variation in the *Plasmodium falciparum* gamete surface protein gene Pfs48/45 compared with microsatellite loci. *Molecular and biochemical parasitology*. 2001;115(2): 145–156.
277. Juliano JJ, Parobek CM, Brazeau NF, Ngasala B, Randrianariveolosia M, Lon C, et al. Pooled Amplicon Deep Sequencing of Candidate *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine Antigens. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016;94(1): 143–146.
278. Machado RLD, Pova MM, Calvosa VSP, Ferreira MU, Rossit ARB, dos Santos EJM, et al. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(9): 1547–1555.
279. Griffing SM, Viana GMR, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, de Oliveira AM, et al. Historical Shifts in Brazilian *P. falciparum* Population Structure and Drug Resistance Alleles. *PLoS ONE*. 2013;8(3): e58984.
280. Nabet C, Doumbo S, Jeddi F, Konaté S, Manciuilli T, Fofana B, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in human malaria cases in Mali. *Malaria journal*. 2016;15(1): 353.
281. Anderson TJC, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biology and Evolution*. 2000;17(10): 1467–1482.
282. Barry AE, Schultz L, Buckee CO, Reeder JC. Contrasting population structures of the genes encoding ten leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *PloS one*. 2009;4(12): e8497.
283. Ochola LI, Tetteh KKA, Stewart LB, Riitho V, Marsh K, Conway DJ. Allele frequency-based and polymorphism-versus-divergence indices of balancing

- selection in a new filtered set of polymorphic genes in *Plasmodium falciparum*. *Molecular biology and evolution*. 2010;27(10): 2344–2351.
284. Oyebola KM, Idowu ET, Olukosi YA, Awolola TS, Amambua-Ngwa A. Pooled-DNA sequencing identifies genomic regions of selection in Nigerian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Parasites & Vectors*. 2017;10(1): 320.
285. Singh S, Soe S, Weisman S, Barnwell JW, Pérignon JL, Druilhe P. A conserved multi-gene family induces cross-reactive antibodies effective in defense against *Plasmodium falciparum*. *PloS one*. 2009;4(4): e5410.
286. Kuamsab N, Putaporntip C, Jongwutiwes S. Polymorphism and natural selection in the merozoite surface protein 3F2 (PVX\_97710) locus of *Plasmodium vivax* among field isolates. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;78: 104058.
287. Chaves LB, Perce-da-Silva D de S, Totino PRR, Riccio EKP, Baptista B de O, de Souza ABL, et al. *Plasmodium vivax* ookinete surface protein (Pvs25) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019;73: 287–294.
288. Lin LY, Huang HY, Liang XY, Xie DD, Chen JT, Wei HG, 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. *Malaria Journal*. 2021;20(1): 124.
289. Ju HL, Kang JM, Moon SU, Kim JY, Lee HW, Lin K, et al. Genetic polymorphism and natural selection of Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* Myanmar isolates. *Malaria Journal*. 2012;11(1): 60.

## 8. APÊNDICES E/OU ANEXOS

### Anexo I – Parecer do Comitê de Ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** LILIAN ROSE PRATT RICCIO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 46084015.1.0000.5248

**Instituição Proponente:** Instituto Oswaldo Cruz-RJ

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.420.848

##### Apresentação do Projeto:

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

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

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

Continuação do Parecer: 1.420.848

última linha de tratamento, e inseticidas disponíveis atualmente

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

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

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

Continuação do Parecer: 1.430.846

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

**Critério de Inclusão:**

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

**Critério de Exclusão:**

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

**Plano amostral:**

Com malária (grupo 1) 100 Coleta de sangue e dados pessoais, clínicos e epidemiológicos  
Controle (grupo 3) 120 Coleta de sangue e dados pessoais, clínicos e epidemiológicos  
Sem malária (grupo 2) 100 Coleta de sangue e dados pessoais, clínicos e epidemiológicos

**Centros Coparticipantes:**

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

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

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

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

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

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 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: 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 ADCC;

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

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

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma ("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. Além disso, todos os cuidados para garantir que as informações contidas no questionário serão utilizadas única e exclusivamente para geração de dados para este projeto. As informações serão sigilosas e os indivíduos receberão um número de registro para impossibilitar a sua identificação. Esse questionário ficará sob a guarda do Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ. O acesso a qualquer informação do questionário estará restrita à coordenadora do projeto.

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

Continuação do Parecer: 1.420.848

**Benefícios:**

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

**1)PROJETO:**

**a) Delineamento do estudo:**

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

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

Pendência atendida.

**b) Metodologia:**

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

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

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)2581-4815 E-mail: cepfocruz@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)2561-4815 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)3882-9011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.420.848

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

Pendência atendida.

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

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

Pendência atendida.

• "A linguagem tanto no TCLE quanto no TALE foi adaptada tornando-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 706 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.430.846

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)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.420.848

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de Rosto Folha de Rosto.pdf

TCLE / Termos de Assentimento / ANEXOIIIITALE.docx

TCLE / Termos de Assentimento / ANEXOIIITCLEcontroles.docx

TCLE / Termos de Assentimento/ ANEXOITCLEmalaria.docx

Carta resposta.docx

ANEXO V quest.docx

ANEXO IV decoord.docx

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 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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)2581-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.420.846

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_515909.pdf	04/12/2015 20:41:47		Aceito
Outros	ANEXOvquest.docx	04/12/2015 20:40:16	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Outros	Cartaresposta.docx	04/12/2015 20:37:14	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.doc	04/12/2015 20:36:40	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Outros	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	ANEXOITCLEcontroles.docx	04/12/2015 20:28:28	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOITCLEmalaria.docx	04/12/2015 20:27:59	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AcordoMVGL.pdf	04/12/2015 20:26:42	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoMUF.pdf	04/12/2015 20:24:23	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ACORDOMUF.pdf	04/12/2015 20:20:05	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaUSP.pdf	04/12/2015 20:19:11	LILIAN ROSE PRATT RICCIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaMarcusLacerda_Lilian.pdf	04/12/2015 18:39:22	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	Orçamento.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)3882-0011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: capfioacruz@ioc.fiocruz.br





FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.420.846

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

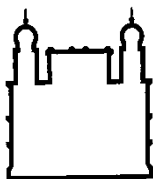
RIO DE JANEIRO, 23 de Fevereiro de 2016

---

Assinado por:  
José Henrique da Silva Pilotto  
(Coordenador)

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

## 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.

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

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

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

Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (“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 usado para casos desse tipo. Todas as informações de tratamento serão dadas pelo profissional de saúde (médico e o enfermeiro responsável pela assistência) e qualquer alteração deverá ser comunicada ao pessoal responsável que verificará a necessidade de cuidados locais.

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

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

Os dados e todas as informações dadas por você estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/Fiocruz do Ministério da Saúde. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e o acesso e a análise dos dados

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

coletados se farão apenas pelos pesquisadores envolvidos no projeto. A sua participação é inteiramente voluntária e você é livre para recusar a participar, assim como para desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para seu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_\_

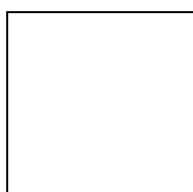
**Assinatura do Pesquisador**

\_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_\_

**Assinatura Testemunha**

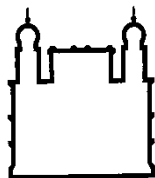
\_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_\_

**Assinatura do voluntário**



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

## Anexo 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 usado para casos desse tipo. Todas as informações de tratamento serão dadas pelo profissional de

Rubrica do responsável do voluntário
Rubrica do voluntário da pesquisa
Rubrica do pesquisador

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

Rubrica do responsável do voluntário

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

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: \_\_\_\_\_

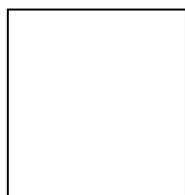
**Assinatura Testemunha**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Assinatura Responsável**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Assinatura do menor voluntário**

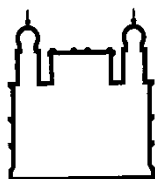


Em caso de  
impossibilidade de o  
responsável assinar inserir



Em caso de  
impossibilidade de o menor  
assinar inserir impressão digital

## Anexo IV - Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE) - 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 feitos os seguintes exames, procedimentos com os seguintes objetivos:**

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador



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

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

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

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

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

Rubrica do voluntário da pesquisa

Rubrica do pesquisador

ou freezer -70°C e ficará sob a guarda da coordenadora do projeto, no Laboratório de Pesquisas em Malária – Fiocruz/RJ pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados.

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

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

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
**Assinatura do Pesquisador**

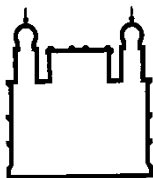
\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
**Assinatura Testemunha**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
**Assinatura do Voluntário**



Em caso de analfabetismo ou  
impossibilidade de assinar  
inserir impressão digital

## Anexo V - 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		
JA 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

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

<b>SINTOMAS</b> <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
<b>DATA DO INICIO DOS SINTOMAS:</b>
<b>DIAGNÓSTICO:</b> <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
<b>PARASITEMIA:</b>
<b>LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO:</b> <b>RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE?:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não      Data: <b>É DOADOR DE SANGUE?:</b> <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 VI – Alinhamento da sequência referência 3D7 com as sequências obtidas no estudo

259

371

<b>REF 3D7</b>	ACAAGT <b>G</b> GAGAATAGAAATA <b>A</b> AA <b>C</b> GAAT <b>T</b> CGGGG <b>G</b> TCCTAAAT <b>T</b> AAGGGGTAATGTTACAAGTAATATAAAGTTCCCATCAGATAACAAAGGTAAAATTATAAGAGGTT <b>C</b> GAATG
<b>V1g</b>	-----C-----T-----T-----C-----
<b>V2g</b>	-----C-----C-----
<b>V3g</b>	-----CC-----G-----C-----T-----C-----C-----T-----C-----
<b>V4g</b>	-----
<b>V5g</b>	-----C-----T-----C-----
<b>V6g</b>	-----
<b>V7g</b>	-----
<b>V8g</b>	-----G-----
<b>V9g</b>	-----
<b>V10g</b>	-----
<b>V11g</b>	-----
<b>V12g</b>	-----
<b>V13g</b>	-----
<b>V14g</b>	-----G-----
<b>V15g</b>	-----G-----
<b>V16g</b>	-----G-----
<b>V17g</b>	-----
<b>V18g</b>	-----
<b>V19g</b>	-----
<b>V20g</b>	-----
<b>V21g</b>	-----G-----
<b>V22g</b>	-----G-----
<b>V23g</b>	-----G-----
<b>V24g</b>	-----
<b>V25g</b>	-----G-----

372

487

REF 3D7 ATAAACTTAATAAAAACTCTGAAGATGTTTTAGAACAAAGCGAAAAATCGCTTGTTTCAGAAAATGTCCTAGTGGATTAGATATAGATGATATCCCTAAAGAATCTATTTTTAT

V1g --C-----  
V2g --C-----  
V3g --C-----  
V4g --C-----  
V5g --C-----  
V6g --C-----A-----  
V7g --C-----G-----  
V8g --C-----  
V9g --C-----  
V10g --C-----  
V11g --C-----  
V12g --C-----  
V13g --C-----  
V14g --C-----  
V15g --C-----  
V16g --C-----  
V17g --C-----  
V18g --C-----  
V19g --C-----  
V20g --C-----G-----  
V21g --C-----  
V22g --C-----  
V23g --C-----  
V24g --C-----  
V25g --C-----

488

602

<b>REF 3D7</b>	TCAAGAAGATCAAGAAGGTCAAACCTATTCTGAATTAATCCTGAAACATCAGAACATAGTAAAGATTTAAATAATAATGATTCAAAAAATGAATCTAGTGATATTATTCAGT
<b>V1g</b>	-----A-----A-----A
<b>V2g</b>	-----A
<b>V3g</b>	-----A-----A-----A
<b>V4g</b>	-----A
<b>V5g</b>	-----A-----A-----A
<b>V6g</b>	-----A-----A-----A
<b>V7g</b>	-----A
<b>V8g</b>	-----A-----A-----A
<b>V9g</b>	-----A-----A-----A
<b>V10g</b>	-----A-----A-----A
<b>V11g</b>	-----A
<b>V12g</b>	-----A
<b>V13g</b>	-----A
<b>V14g</b>	-----A
<b>V15g</b>	-----A
<b>V16g</b>	-----A-----A-----A
<b>V17g</b>	-----A
<b>V18g</b>	-----A-----A-----A
<b>V19g</b>	-----A
<b>V20g</b>	-----A-----A-----A
<b>V21g</b>	-----A-----A-----A
<b>V22g</b>	-----A-----A-----A
<b>V23g</b>	-----A-----A-----A
<b>V24g</b>	-----A-----A-----A
<b>V25g</b>	-----A

603

718

REF 3D7

AAATAATAAATCAAATAAAGTACAAAATCATTTTGAATCATTATCAGATTTAGAATTACTTGAAAATTCTCACAAAGATAATTTAGACAAAGATACAATTTCAACAGAACCTTTT

V1g

-----G--G-----C-----C-----

V2g

-----

V3g

-----G--G-----C-----C-----

V4g

-----

V5g

-----G--G-----C-----C-----

V6g

-----G--G-----C-----C-----

V7g

-----

V8g

-----G--G-----C-----C-----

V9g

-----G--G-----C-----C-----

V10g

-----G--G-----C-----C-----

V11g

-----

V12g

-----

V13g

-----

V14g

-----

V15g

-----

V16g

-----G--G-----C-----C-----

V17g

-----

V18g

-----G--G-----C-----C-----

V19g

-----

V20g

-----G--G-----C-----C-----

V21g

-----G--G-----C-----C-----

V22g

-----G--G-----C-----C-----

V23g

-----G--G-----C-----C-----

V24g

-----G--G-----C-----C-----

V25g

-----



719

833

REF 3D7 CCTAATCAAAAACATAAAGACTTACAACAAGATTTAAATGATGAACCTTTAGAACCTTTCCTACACAAATACATAAAGATTATAAAGAAAATAATTTAATAAATGAAGAAGAT

V1g -----G-----

V2g -----

V3g -----G-----

V4g -----

V5g -----G-----

V6g -----G-----

V7g -----

V8g -----G-----

V9g -----T-----G-----

V10g -----G-----

V11g -----G-----

V12g -----

V13g -----

V14g -----

V15g -----

V16g -----G-----

V17g -----

V18g -----G-----

V19g -----

V20g -----G-----

V21g -----G-----

V22g -----G-----

V23g -----G-----

V24g -----G-----

V25g -----

834

947

REF 3D7

TCAGAACCATTTCCAGACAAAGCATAAAAAGGTAGACAATCATAATGAAGAAAAAACGTATTTTCATGAAAATGGTTCTGCAAATGGTAATCAAGGAAGTTGAACTTAA

V1g	-----G-----CA-----C--
V2g	-----G-----
V3g	-----G-----CA-----C--
V4g	-----G-----
V5g	-----G-----CA-----C--
V6g	-----G-----CA-----C--
V7g	-----G-----
V8g	-----G-----CA-----C--
V9g	-----G-----CA-----C--
V10g	-----G-----CA-----C--
V11g	-----G-----CA-----
V12g	-----G-----CA-----C--
V13g	-----G-----
V14g	-----G-----
V15g	-----G-----
V16g	-----G-----CA-----C--
V17g	-----G-----
V18g	-----G-----CA-----C--
V19g	-----G-----
V20g	-----G-----CA-----C--
V21g	-----G-----CA-----C--
V22g	-----G-----CA-----C--
V23g	-----G-----CA-----C--
V24g	-----G-----CA-----C--
V25g	-----G-----

948

1062

REF 3D7

ATCATTGATGAACATTTAAAAGATGAAAAAATAGAAAATGAACCACTTGTTTCATGAAAATTTATCCATACCAAATGATCCAATAGAACAAAATATTAATCAACCTGAACAAGA

V1g	-----
V2g	-----T-----
V3g	-----
V4g	-----
V5g	-----
V6g	-----
V7g	-----T-----
V8g	-----
V9g	-----
V10g	-----
V11g	-----
V12g	-----
V13g	-----T-----
V14g	-----T-----
V15g	-----T-----
V16g	-----
V17g	-----T-----
V18g	-----
V19g	-----T-----
V20g	-----
V21g	-----
V22g	-----
V23g	-----
V24g	-----
V25g	-----T-----

REF 3D7 AACAAATATCCAGGGAACAATTGTATAATGAAAAACAAAATGTTGAAGAAAAACAAAATTCTCAAATACCTTCGTTAGATTTAAAAGAACCAACAAATGAAGATATTTTACCAAA

- V1g
- V2g
- V3g
- V4g
- V5g
- V6g
- V7g
- V8g
- V9g
- V10g
- V11g
- V12g
- V13g
- V14g
- V15g
- V16g
- V17g
- V18g
- V19g
- V20g
- V21g
- V22g
- V23g
- V24g
- V25g

1178

1292

REF 3D7 TCATAATCCATTAGAAAATATAAAAACAAAGTGAATCAGAAATAAATCATGTACAAGATCATGCGCTACCAAAAGAGAATATAATAGACAACTTGATAATCAAAAAGAACACAT

V1g -----

V2g -----

V3g -----

V4g -----

V5g -----

V6g -----

V7g -----

V8g -----

V9g -----

V10g -----

V11g -----

V12g -----

V13g -----

V14g -----

V15g -----

V16g ----- A -----

V17g -----

V18g -----

V19g -----

V20g -----

V21g -----

V22g ----- A -----

V23g ----- A -----

V24g -----

V25g -----

1293

1407

REF 3D7 CGATCAATCACAAACATAATATAAAATGTATTACAAGAAAATAACATAAACAATCACCAATTAGAACCTCAAGAGAAACCTAATATTGAATCGTTTGAACCTAAAAATATAGATTC

V1g -----

V2g -----

V3g -----

V4g -----

V5g -----

V6g -----

V7g -----

V8g -----

V9g -----

V10g -----

V11g -----

V12g -----

V13g -----

V14g -----

V15g -----

V16g -----

V17g -----

V18g -----

V19g -----

V20g -----

V21g -----G-----

V22g -----

V23g -----

V24g -----

V25g -----

1408

1522



**REF 3D7** AGAAATTATTCTTCTGAAAATGTTGAAACAGAAGAAATAATAGATGATGTGCCTTCCCCTAAACATTCTAACCATGAAACATTTGAAGAAGAAACAAGTGAATCTGAACATGA

**V1g** -----

**V2g** -----

**V3g** -----

**V4g** -----

**V5g** -----

**V6g** -----

**V7g** -----

**V8g** -----

**V9g** -----

**V10g** -----

**V11g** -----

**V12g** -----

**V13g** -----

**V14g** -----

**V15g** -----

**V16g** -----

**V17g** -----

**V18g** -----

**V19g** -----

**V20g** -----

**V21g** -----

**V22g** -----

**V23g** -----

**V24g** -----

**V25g** -----

1523

1634

REF 3D7 AGAAGCCGTATCTGAAAAAATGCCACGAAACTGTCGAACATGAAGAACTGTGTCTCAAGAAAGCAATCCTGAAAAAGCTGATAATGATGGAAATGTATCTCAAAACAG

V1g -----

V2g -----

V3g -----

V4g -----

V5g -----

V6g -----

V7g -----

V8g -----

V9g -----

V10g -----

V11g -----

V12g -----

V13g -----

V14g -----

V15g -----

V16g -----

V17g -----G-----

V18g -----

V19g -----

V20g -----

V21g -----

V22g -----T--T-----

V23g -----TG--T-----

V24g -----G-----

V25g -----T-----



1635

1693

<b>REF 3D7</b>	CAACAACGAATTAATGAAAATGAATTCGTTGAATCGGAAAAAAGCGAGCATGAAGCA
<b>V1g</b>	-----
<b>V2g</b>	-----
<b>V3g</b>	-----
<b>V4g</b>	-----
<b>V5g</b>	-----
<b>V6g</b>	-----
<b>V7g</b>	-----
<b>V8g</b>	-----
<b>V9g</b>	-----
<b>V10g</b>	-----
<b>V11g</b>	-----
<b>V12g</b>	-----
<b>V13g</b>	-----
<b>V14g</b>	-----
<b>V15g</b>	-----
<b>V16g</b>	-----
<b>V17g</b>	-----
<b>V18g</b>	-----
<b>V19g</b>	-----
<b>V20g</b>	-----
<b>V21g</b>	-----
<b>V22g</b>	-----
<b>V23g</b>	-----
<b>V24g</b>	-----
<b>V25g</b>	-----

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

463 564

REF 3D7 AAAACAAAAGAATATGCTGAAAAAGCAAAAAATGCTTATGAAAAGGCAAAAAATGCTTATCAAAAAGCAAACCAAGCTGTTTTAAAAGCAAA AGAAGCTTC

V1m -----C-----G-----

V2m -----CC-----G-----

565 667

REF 3D7 TAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGGCGTTCCAGAACACAAAAAGAAGAAAATATGTTATCACATTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAG

V1m -----

V2m -----

668 747

REF 3D7 GAAAATATATCTAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAGGAAGAAGAGGCAGAAGAAACAGAAGAAGAAGAACTTGA

V1m -----

V2m -----

Alinhamento entre a sequência referência 3D7 e as sequências de nucleotídeos das variantes de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente ao gene *PfMSP-3*. A marcação em laranja são os nucleotídeos alterados. Os traços correspondem aos nucleotídeos que não se alteraram.



197

304



REF 3D7	I	S	V	N	N	K	S	N	K	V	Q	N	H	F	E	S	L	S	D	L	E	L	L	E	N	S	S	Q	D	N	L	D	K	D	T	I	S	T	E	P	F	P	N	Q	K	H	K	D	L	Q	D	L	N	D	E	P	L	E	P	F	P	T	Q	I	H	K	D	Y	K	E	K	N	L	I	N	E	E	D	S	E	P	F	P	R	O	K	H	K	K	V	D	N	H	N	E	E	K	N	V	F	H	E	N	G	S	A
V1g	---	E	-----																													-----	E	-----																																																																								
V2g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V3g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V4g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V5g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V6g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V7g	---	E	-----																													-----	E	-----																																																																								
V8g	---	E	-----																													-----	E	-----																																																																								
V9g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V10g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V11g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V12g	---	E	-----																													-----	E	-----																																																																								
V13g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V14g	---	E	-----																													-----	E	-----																																																																								
V15g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V16g	---	E	-----																													-----	E	-----																																																																								
V17g	---	E	-----																													-----	E	-----																																																																								
V18g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V19g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									
V20g	---	E	-----																													-----	E	-----																																																																								
V21g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----	F	-----																E	-----	E	-----																																																																												
V22g	---	E	-----	GE	-----	F	-----	P	-----																					E	-----	E	-----																																																																									

REF 3D7 NGNQGSLKLSFDEHLKDEKIENEPLVHENLSIPNDPIEQILNQPEQETNIQEQLYNEKQNVEEKQNSQIPSLDLKEPTNEDILPNHNPLENIKQSESEINHVQDHALPK

V1g	-----S-----
V2g	-----Q-----Q-----
V3g	-----Q-----Q-----
V4g	-----Q-----Q-----
V5g	-----Q-----Q-----R-----K-----
V6g	-----Q-----Q-----R-----K-----
V7g	-----S-----R-----
V8g	-----S-----
V9g	-----Q-----Q-----
V10g	-----Q-----Q-----
V11g	-----Q-----Q-----
V12g	-----S-----
V13g	-----Q-----Q-----R-----
V14g	-----Q-----
V15g	-----Q-----Q-----R-----
V16g	-----R-----
V17g	-----S-----
V18g	-----Q-----Q-----
V19g	-----Q-----Q-----
V20g	-----Q-----
V21g	-----Q-----Q-----
V22g	-----Q-----Q-----

415

525



REF 3D7 ENIIDKLDNQKEHIDQSQHNI NVLQENNINNHQLQEPQEKPNIESFEPKNIDSEIILPENVETEEIIDVPSPKHSNHETFEETSESEHEEAVSEKNAHETVEHEETVSQE

V1g -----V-----

V2g -----

V3g -----

V4g -----LV-----

V5g -----LV-----

V6g -----

V7g -----

V8g -----

V9g -----

V10g -----

V11g -----

V12g -----

V13g -----

V14g -----

V15g -----

V16g -----

V17g -----

V18g -----K-----

V19g -----Q-----

V20g -----

V21g -----

V22g -----

526 559



REF 3D7 SNPEKADNDGNVVSQNSNNELNENEFVESEKSEHE

V1g -----  
V2g -----  
V3g -----  
V4g -----  
V5g -----  
V6g -----  
V7g -----  
V8g -----  
V9g -----  
V10g -----  
V11g -----  
V12g -----  
V13g -----  
V14g -----  
V15g -----  
V16g -----  
V17g -----  
V18g -----  
V19g -----  
V20g -----  
V21g -----  
V22g -----

Comparação entre a sequência referência 3D7 e as sequências de aminoácidos dos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente a *PfGLURP*. A marcação em laranja são os aminoácidos alterados. A marcação em verde são os aminoácidos que não se alteraram. A marcação em azul indica uma substituição de aminoácido sinônima e uma substituição de aminoácido não-sinônima. Os traços correspondem os aminoácidos que não se alterara.

155 249

REF 3D7 KTKEYAEQVEKDYEKAKNAYQKANQAVLKAKEASSYDYILGWEFGGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKDKENISKENDDVLDEKEEEAEETEEEELE

V1m -----H--R-----

V2m -----P--R-----

Comparação entre a sequência referência 3D7 e as sequências de aminoácidos dos isolados de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Guajará referente a *PfMSP-3*. A marcação em laranja indica o aminoácido alterado. Os traços correspondem os aminoácidos que não se alteraram.



## **Anexo VIII – Coautoria em artigo**

**Chloroquine and mefloquine resistance profiles are not related to the circumsporozoite protein (CSP) VK210 subtypes in field isolates of *Plasmodium vivax* from Manaus, Brazilian Amazon.**

Lilian Rose Pratt-Riccio, **Barbara de Oliveira Baptista**, Vanessa Rodrigues Torres, Cesare Bianco-Junior, Daiana de Souza Perce-da-Silva, Evelyn Kety Pratt Riccio, Josué da Costa Lima-Junior, Paulo Renato Rivas Totino, Gustavo Capatti Cassiano, Luciane Moreno Storti-Melo, Ricardo Luiz Dantas Machado, Joseli de Oliveira-Ferreira, Dalma Maria Banic, Leonardo José de Moura Carvalho, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro.

# Chloroquine and mefloquine resistance profiles are not related to the circumsporozoite protein (CSP) VK210 subtypes in field isolates of *Plasmodium vivax* from Manaus, Brazilian Amazon

Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>1,2/+</sup>, Bárbara de Oliveira Baptista<sup>1,2</sup>, Vanessa Rodrigues Torres<sup>1,2</sup>, Cesare Bianco-Junior<sup>1,2</sup>, Daiana de Souza Perce-Da-Silva<sup>1,2</sup>, Evelyn Kety Pratt Riccio<sup>1,2</sup>, Josué da Costa Lima-Junior<sup>3</sup>, Paulo Renato Rivas Totino<sup>1,2</sup>, Gustavo Capatti Cassiano<sup>4</sup>, Luciane Moreno Storti-Melo<sup>5</sup>, Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>6</sup>, Joseli de Oliveira-Ferreira<sup>3</sup>, Dalma Maria Banic<sup>7</sup>, Leonardo José de Moura Carvalho<sup>1,2</sup>, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Malária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunoparasitologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>4</sup>Universidade de Campinas, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Laboratório de Doenças Tropicais, Campinas, SP, Brasil

<sup>5</sup>Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia, Aracaju, SE, Brasil

<sup>6</sup>Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Niterói, RJ, Brasil

<sup>7</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunologia Clínica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**BACKGROUND** The central repetitive region (CRR) of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite surface protein (CSP) is composed of a repetitive sequence that is characterised by three variants: VK210, VK247 and *P. vivax*-like. The most important challenge in the treatment of *P. vivax* infection is the possibility of differential response based on the parasite genotype.

**OBJECTIVES** To characterise the CSP variants in *P. vivax* isolates from individuals residing in a malaria-endemic region in Brazil and to profile these variants based on sensitivity to chloroquine and mefloquine.

**METHODS** The CSP variants were determined by sequencing and the sensitivity of the *P. vivax* isolates to chloroquine and mefloquine was determined by Deli-test.

**FINDINGS** Although five different allele sizes were amplified, the sequencing results showed that all of the isolates belonged to the VK210 variant. However, we observed substantial genetic diversity in the CRR, resulting in the identification of 10 different VK210 subtypes. The frequency of isolates that were resistant to chloroquine and mefloquine was 11.8 and 23.8%, respectively. However, we did not observe any difference in the frequency of the resistant isolates belonging to the VK210 subtypes.

**MAIN CONCLUSION** The VK210 variant is the most frequently observed in the studied region and there is significant genetic variability in the CRR of the *P. vivax* CSP. Moreover, the antimalarial drug sensitivity profiles of the isolates does not seem to be related to the VK210 subtypes.

Key words: malaria – *Plasmodium vivax* – circumsporozoite protein – chemoresistance

Despite remarkable progress in the control of malaria, it still remains a public health problem in several countries where the disease is endemic. According to the latest World Health Organization (WHO) estimates, nearly half of the world's population is at risk of malaria infection and 91 countries and territories have been classified as endemic. In 2017, 219 million cases and 435,000 deaths from this disease were reported worldwide and

the victims were mainly children under the age of five years. Most of these cases (92%) and deaths (93%) occurred in Africa, followed by Southeast Asia and the East Mediterranean Region.<sup>(1)</sup> Of the six *Plasmodium* species that infect humans, *Plasmodium vivax* is the most widespread, being responsible for around 3.4% of the estimated global cases. However, outside the African continent, this proportion is over 36%. *P. vivax* is the most predominant parasite in the entire continent of America, representing approximately 74% of all malaria cases. In the East Mediterranean region, it represents over 31% of the cases and in East Asia, 37%.<sup>(1)</sup> In Brazil, *P. vivax* represented around 90% of the 194,000 malaria cases registered in 2017.<sup>(2)</sup> Although *P. vivax* infection is considered to be clinically milder than *Plasmodium falciparum* infection, there have been cases of severe malaria and death due to *P. vivax* infection in many endemic areas, including Brazil.<sup>(3)</sup>

The *P. vivax* circumsporozoite surface protein (CSP), which is the most abundant polypeptide present on the surface of the sporozoite, is a well-characterised antigen

doi: 10.1590/0074-02760190054

Financial support: IOC-Fiocruz, Faperj, Capes, CNPq. LRPR is supported by CNPq/Papes-Fiocruz. CTDR, LJMC and JCLJ are recipients of a research productivity fellowship from CNPq and a grant from Faperj as Cientistas do Nosso Estado.

+ Corresponding author: riccio@ioc.fiocruz.br

● <https://orcid.org/0000-0003-4002-5889>.

Received 6 February 2019

Accepted 24 June 2019



and one of the few vaccine candidates for *P. vivax* tested in clinical trials.<sup>(4)</sup> CSP is involved in the motility and invasion of the sporozoite into the hepatocytes and represents an important vaccine target, since anti-CSP antibodies from naturally infected individuals or from volunteers immunised with irradiated sporozoites are able to inhibit the invasion of hepatocytes by live sporozoites *in vitro*.<sup>(5,6)</sup> The *csp* gene encodes for a protein that is characterised by two highly conserved terminal non-repetitive regions (N- and C-terminal) flanking a highly immunogenic, central repetitive domain. The central repetitive region (CRR) of the CSP is composed of one of two possible nonapeptides that repeats in tandem, GDRA(A/D)GQPA and ANGA(G/D)(N/D)QPG, which are characteristic of the VK210 and VK247 CSP variants, respectively. These nonapeptide sequences are repeated nearly 20 times in their corresponding proteins. Besides these two variants, a third, known as *P. vivax*-like, has an 11-mer repetitive sequence, APGANQ(E/G)GGAA.<sup>(7-10)</sup> However, there have been reports on polymorphisms related to the number of the residues in these CRR and several synonymous and non-synonymous point mutations.<sup>(11)</sup> The CSP variants have been found at variable frequencies in different malaria endemic areas. Previous studies have used serological and molecular analysis to describe the occurrence of these three variants in both pure and mixed infections in Brazil.<sup>(6,12,13)</sup>

The distribution of these variants seems to be universal and the infections caused by the CSP variants seems to be associated with vector preference and susceptibility, symptom severity, clinical signs, humoral response patterns, parasite burden and cytokine balance.<sup>(10,14-16)</sup> Another important issue is that the response to the treatment might possibly differ depending on the genotype of the parasite. A study performed by Kain et al.<sup>(17)</sup> suggested that the response to chloroquine varies depending on the *P. vivax* CSP variants as both single VK210 as well as VK210/VK247 mixed infections took longer to clear when compared to single VK247 infection in Thailand.

The first reports of chloroquine-resistant *P. vivax* isolates were obtained from Papua New Guinea and Indonesia in 1989. In Brazil, the first reported case of chloroquine-resistant *P. vivax* was from a patient treated in Manaus, state of Amazonas, in the Brazilian Amazon. Later, subsequent studies assessed the efficiency of standard supervised therapy or the *in vitro* profile of chloroquine-resistance showing failure rates of chloroquine treatment between 5 and 10%<sup>(18,19)</sup> with approximately 10% chloroquine-resistance profile seen in short-term culture.<sup>(20)</sup> *In vitro* resistance of *P. vivax* isolates to mefloquine in Manaus has also been described to be at variable frequencies.<sup>(20)</sup>

In the present study, we characterised the CSP variants in the *P. vivax* isolates from individuals residing in malaria-endemic area of the Brazilian Amazon and studied the sensitivity profiles of these parasites to chloroquine and mefloquine using short-term *in vitro* cultures.

#### MATERIALS AND METHODS

**Study site and isolates** – This study was carried out in the city of Manaus. A total of 95 *P. vivax* isolates

were collected from patients who sought health care at Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) between 2004 and 2007, as previously described.<sup>(20)</sup>

We obtained written informed consent from all the donors and venous blood samples were drawn in Vacutainer® (Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA) ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tubes. For determination of drug sensitivity, the tubes containing the blood samples were maintained at 4°C before the *in vitro* culture was initiated.

For molecular analysis, the tubes were centrifuged at 350 g for 10 min to remove the plasma and the pellet was stored at -20°C. The pellets, containing the peripheral blood cells, were mixed with equal volumes of a cryopreservation solution (0.9% NaCl/4.2% sorbitol/20% glycerol) and were stored in liquid nitrogen until further use. Thin and thick blood smears were examined to identify the malaria parasites and determine presence of parasitaemia by two technicians who were experts in malaria microscopy from FMT-HVD and from the Laboratório de Pesquisa em Malária (Laboratory of Malaria Research) [Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)], which is the headquarters of the Centro de Pesquisa e Treinamento em Malária of the Secretaria de Vigilância em Saúde (Center for Malaria Research and Training, Department of Health Surveillance), a reference centre for malaria diagnosis in the extra-Amazonian Region for the Brazilian Ministry of Health. Thick blood smears from all of the subjects were stained with Giemsa and a total of 200 microscopic fields were examined under a 1,000-fold magnification. Thin blood smears of the positive samples were examined for species identification. The parasite density was evaluated by counting the parasites in a predetermined number of white blood cells in the thick blood films, and the number of blood parasites per millilitre was calculated. To increase the sensitivity of the parasite detection, molecular analyses using specific primers for genus (*Plasmodium* sp.) and species (*P. falciparum* and *P. vivax*) were performed for all of the samples.

All the patients enrolled in this study complied with the following criteria: (i) they presented symptoms; (ii) they were infected with only *P. vivax*; (iii) they did not use any chemoprophylaxis or any antimalarial drugs as self-treatment; (iv) they were 12 years of age or older; (v) women were not pregnant or breast feeding; and, (vi) blood collection was performed on the day of diagnosis before malaria treatment. After the malaria diagnosis and blood sample collection, the patients were immediately treated according to the Brazilian Ministry of Health standards for malaria therapy.

**Ethics statement** – The study protocol was reviewed and approved by the Fiocruz Ethical Committee (protocol 221/03), which included obtaining the patients' written consents in order to use their blood samples for research. Written informed consent was obtained from all the adult donors or from the parents of the donors in the case of minors. All the procedures adopted in this study fully complied with the specific federal permits issued by the Brazilian Ministry of Health.

**Characterisation of the CSP variants** – The CSP variants were determined by PCR-sequencing. DNA was extracted from the blood samples using the QIAamp DNA blood midi kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) according to manufacturer instructions and stored at -20°C until amplification. The *csp* gene of each sample was amplified by two independent, conventional polymerase chain reaction (PCR) methods using either of the following two pairs of primers: AL60 5'-GTCG-GAATTCATGAAGAACTTCATTCTC-3' (forward) and AL61 5'-CAGCGGATCCTTAATTGAATAAT-GCTAGG-3' (reverse), or PVCSP1 5'-AGGCAGAG-GACTTGGTGAGA-3' (forward) and PVCSP2 5'-CCA-CAGGTTACTGCATGG-3' (reverse) (Genone Biotechnologies, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All the PCR amplifications were carried out in a 50 µL reaction mixture containing 8 µL of genomic DNA, 5 µL of 10X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer and 2.5U of Taq polymerase (Invitrogen, California, CA, USA) kit according to the manufacturer's. The amplifications were performed in a GeneAmp PCR system 9700 thermal cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) using the following steps: an initial cycle of 94°C for 10 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min for the pair of primers AL60/AL61 and an initial cycle of 94°C for 10 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min, for the pair of primers PVCSP1/PVCSP2. In all of the reactions, two negative controls (one without DNA and the other with DNA extracted from an *in vitro* culture of *P. falciparum* PSS1 strain) and a positive control (*P. vivax*-infected sample) were used. Further, 5 µL of the PCR product was electrophoresed at 95V for 90 min along with 0.5 µg/mL 100 base pairs (bp) DNA molecular weight marker (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in 2% agarose gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) in 1x tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (0.04 M TAE, 1 mM EDTA), and the gel was stained by ethidium bromide (EtBr). The target DNA was visualised and the images were captured using an ultraviolet transilluminator (Multi-Doc IT Digital Imaging System UVP). The positive samples were electrophoresed in 2% agarose low melting point gel stained with EtBr. Then, the PCR fragments were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Thermo Fisher) kit according to the manufacturer's protocol and quantified using the Qubit dsDNA HG Assay kit (Invitrogen).

**DNA sequencing and polymorphism analysis** – The specificity of the assay was confirmed by sequencing the PCR products from all of the positive samples using a Big Dye Terminator Ready Reaction version 3.1 (Thermo Fisher), following the manufacturer's instructions. The products that were amplified with the pair of primers AL60 and AL61 were sequenced with primers AL60, AL61, PVCSP1 and PVCSP2. The PCR products amplified with the primer pair, PVCSP1 and PVCSP2 were sequenced with PVCSP1 and PVCSP2. The DNA sequenc-

ing was carried out on the 3730xl DNA analyser (Thermo Fisher) and the results were analysed using the sequence alignment software from DNASTAR (Lasergen, Madison, WI, USA) to identify polymorphism relative to the Belém strain reference sequence from NCBI (EU401923).

Amino acid sequences were aligned by using ClustalW and the phylogenetic tree was reconstructed by the neighbour-joining (NJ) algorithm using the Jones-Taylor-Thorton (JTT) amino acid substitution model, as implemented in the MEGA v6 program. The reliability of the obtained tree was calculated by the bootstrap test based on 100 resamplings.

**Determination of chloroquine and mefloquine sensitivity** – We determined the sensitivity of *P. vivax* isolates towards chloroquine sulphate and mefloquine hydrochloride (Sigma-Aldrich), which were aliquoted in pre-dosed tubes (15 mg/tube). Chloroquine was dissolved in 3 mL of 100% ethanol and 7 mL of Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (Gibco, Invitrogen Life Technologies, California, CA, USA) and mefloquine was dissolved in 10 mL of 100% methanol. From the stock solution, another solution was prepared for each drug at final concentrations of 600 ng/mL for chloroquine and 300 ng/mL for mefloquine, in a 3:1 mix (vol/vol) of RPMI-1640 medium and Waymouth Medium (Sigma-Aldrich). Then, 100 µL of each dilution was added into all the wells in column 1 of the 96-well tissue culture plates (Falcon, Corning, NY, USA), and nine subsequent two-fold dilutions were added into the wells in columns 2 to 9. Wells in columns 10 to 12 were filled with 50 µL of complete culture medium (culture control wells). The concentration of each of the antimalarial drug was tested in quadruplicate.

Samples with parasitaemia ranging from 0.1 to 1% were used directly, whereas samples with parasitaemia higher than 1% were diluted with uninfected O<sub>2</sub>-positive-group erythrocytes to obtain a final parasite density of 0.1 to 1%. Blood samples were washed twice with a solution of RPMI-1640 medium and then resuspended in RPMI-Waymouth (Sigma-Aldrich). Finally, 200 µL of this suspension was added into each well in the antimalarial pre-dosed plates at a 1.2% final haematocrit. The plates were incubated for 48 h at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub> in air) and then frozen and kept at -20°C. Before enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the plates were subjected to three consecutive freeze-thaw cycles in order to lyse the red blood cells.

**ELISA** – The success of the drug sensitivity assay and the appropriate volume of the haemolysed culture were previously determined for each clinical isolate by a preliminary LDH ELISA as a pre-test. To determine which dilution of the haemolysed culture had to be used in the Deli-test, four serial dilutions (1:50, 1:25, 1:12.5 and 1:6.25) of the culture control wells (no drug) of each isolate were tested in a preliminary LDH ELISA. The dilutions were selected based on the wells that displayed optical density (OD) readings ranging from 1 to 2.

ELISA plate (Nunc, Maxisorp, Denmark) wells were coated with 100 µL of monoclonal antibody (MAb) against *P. vivax* (11D) LDH at 1 µg/mL in phosphate-

buffered saline (PBS) (pH 7.4). The plates were incubated overnight at 4°C, washed with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) (fraction V, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany) (PBS-BSA) and then incubated with 300 µL of PBS-BSA for 4 h at room temperature (RT). The plates were maintained at 4°C until further use.

Subsequently, the appropriate volume of the haemolysed culture was transferred to the wells of the ELISA plate with PBS-BSA to a final volume of 100 µL, incubated for 1 h at 37°C, and then washed with PBS-BSA. After the addition of 100 µL per well of a biotinylated MAb against pan-*Plasmodium* LDH (19G7), the plates were incubated for 1 h at 37°C. After washing, a third incubation was done for 30 min at RT with 100 µL of a streptavidin horseradish peroxidase solution followed by a final washing step. The enzyme activity was revealed after 5 min of incubation at RT with 100 µL of tetramethylbenzidine (TMB). The reaction was stopped with 1 M of phosphoric acid and the absorbance was read at 450 nm in a spectrophotometer (Spectramax 250, Molecular Devices, San José, CA, USA).

The concentration-response data were analysed using non-linear regression function to determine the 50% inhibitory concentration of parasite growth (IC<sub>50</sub>), defined as the concentration of the drug required to inhibit 50% of the production of lactate dehydrogenase (LDH) as determined by OD values from sample test wells compared to those obtained from drug-free control wells. The IC<sub>50</sub> threshold values for resistance to chloroquine and mefloquine were 100 nM and 30 nM, respectively, and these values were consistent with previously described results.<sup>(20)</sup>

**Statistical analysis** – The data was stored in the Foxplus® (Borland International Inc, Perrysburg, OH, USA) data bank software. GraphPad InStat and GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) statistical software programs were used for data analysis. Student’s *t* test was used to analyse the differences in IC<sub>50</sub> mean values, and the chi-square test was applied to compare the prevalence of isolates with a resistance profile.

**RESULTS**

**Characterisation of *P. vivax* CSP variants** – Among the 95 isolates analysed, alleles of five different sizes – 1135, 1108, 1081, 1054 and 1027 bp – were amplified with the AL60/AL61 primers and alleles of sizes 786, 759, 732, 705 and 678 bp were amplified with PVCSP1/PVCSP2. The most common allele size was 1135/786 bp, corresponding to the 20 repeat units observed in 44 isolates (46.3%). The allele sizes of 1108/759, 1081/732, 1054/705 and 1027/678 bp corresponding to the 19, 18, 17 and 16 repeat units were observed in 19 (20%), 26 (27.4%), 2 (2.1%) and 4 (4.2%) isolates, respectively. All of the analysed isolates presented only one type of fragment (single infection). In addition to these samples, *P. falciparum* specimens were also tested, but showed negative PCR results with AL60/AL61 or PVCSP1/PVCSP2 primers. Therefore, the 95 samples from individuals infected with *P. vivax*, amplified by PCR, were subjected to sequencing reactions to screen the possible nucleotide polymorphisms of the gene encoding the PvCSP.

Using PCR-sequencing, we identified that all 95 samples from the isolates obtained in Manaus were of the VK210 variant. However, a great genetic diversity in CRR was observed, resulting in 10 different VK210 subtypes,

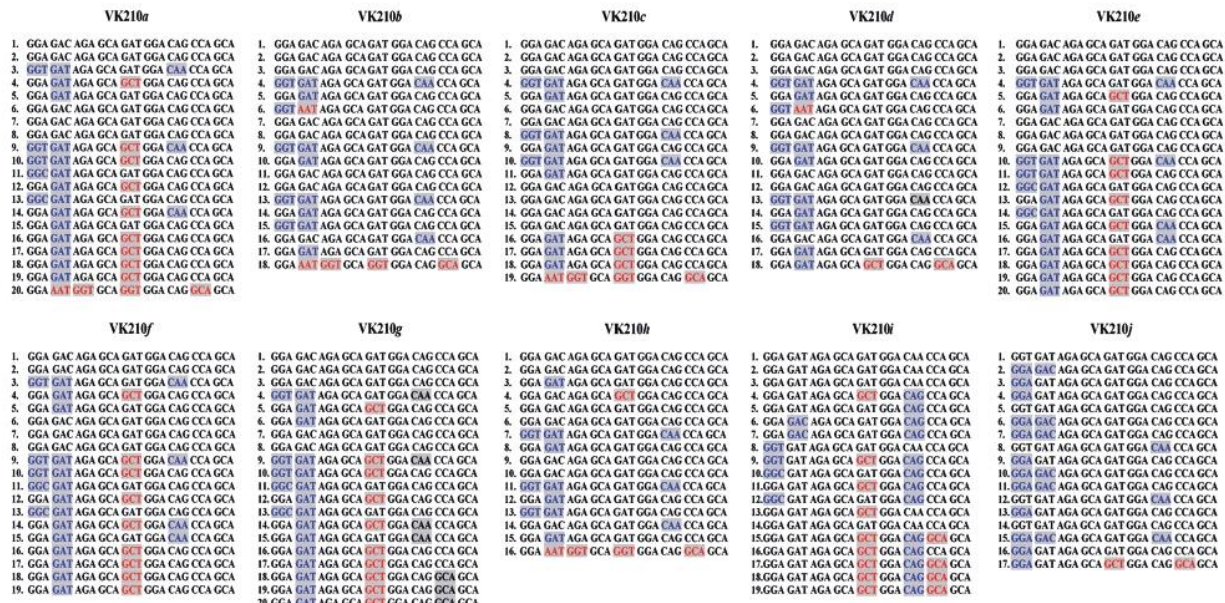


Fig. 1: nucleotide sequence alignment for the central repetitive region (CRR) region of the *csp* gene found in *Plasmodium vivax* isolates with VK210 variant from Brazil. The numbers on the right represent the numbers of nonapeptides presented by the CRR. The letters in blue encode the same amino acid; letters in red encode different amino acid.

named from VK210a to VK210j (Fig. 1). These VK210 subtypes differed in numbers, varying from 16 to 20, and in the arrangements of five different nonapeptide sequences presented in the CRR: GDRADGQPA, GDRAAGQPA, GNRADGQPA, GDRAAGQAA and GNGAGGQAA (Fig. 2). Fig. 3 shows the phylogenetic relationship of the 10 VK210 subtypes from the isolated from Manaus based on the nucleotide sequence of the CRR.

The most frequent subtypes were the VK210a and VK210b found in 38 (40%) and 19 (20%) of the *P. vivax* isolates studied, respectively. The subtypes VK210i, VK210g and VK210j were poorly represented as they were present in only one (1%), two (2.1%) and two (2.1%) of the samples, respectively (Table).

**Sensitivity profile of chloroquine and mefloquine resistance** – Overall, the IC<sub>50</sub> values could be determined in most of the *P. vivax* isolates: 59/95 (62%). For chloroquine, the frequency of *P. vivax* isolates with IC<sub>50</sub> above the threshold of 100 nM was 11.8% (7/59) and the geometric mean for the IC<sub>50</sub> was 53.9 nM (59.3 ± 105.5 nM). For mefloquine, the frequency of isolates with a profile of resistance (IC<sub>50</sub> > 30 nM) was 23.8% (14/59). The geometric mean IC<sub>50</sub> for mefloquine was 31.8 nM (31.8 ± 48 nM) (Fig. 4).

No difference was observed in the frequency of the resistant isolates and in the IC<sub>50</sub> mean for chloroquine or mefloquine based on the VK210 subtypes (Fig. 5). Similarly, there was no observable difference in the frequency of resistant isolates and in the IC<sub>50</sub> mean for chloroquine or mefloquine when the isolates were sepa-

rated temporally or divided into two groups according to their phylogenetic relationship (Group A comprises VK210a, VK210f, VK210g, VK210e and VK210i and Group B comprises VK210b, VK210d, VK210c, VK210h and VK210j) (Fig. 3).

**DISCUSSION**

In the present study, we identified the CSP variants in *P. vivax* isolates from individuals residing in Manaus and showed the difference in the sensitivity profiles of these specimens towards chloroquine or mefloquine. Among the 95 *P. vivax* isolates analysed, five different allele sizes were amplified by PCR, although the sequencing results showed that all the studied isolates were of the VK210 variant, with no occurrence of VK247 or *P. vivax*-like. Similarly, a study performed in a low endemicity area in the state of Acre, Amazon Basin of Brazil, also reported only the VK210 variant in the sympatric *P. vivax* isolates.<sup>(21)</sup> These findings are consistent with results from previous studies reporting that the VK210 variant is the most frequent in malaria-endemic areas of the Brazilian Amazon.<sup>(12,13,22)</sup> In fact, Machado and Póvoa<sup>(12)</sup> suggested that VK210 is the best-adapted variant in Brazil as well as the world, as this variant has also been reported to be predominant in cases from Afghanistan, Iran, Azerbaijan, India, Thailand and Guiana.

However, we did not observe the VK247 variant in our study. This indicate that perhaps the VK247 subtype is not yet fully adapted in all Brazilian malaria-endemic areas, unlike earlier reports from endemic areas in Colombia where the frequency of the VK247 variant was

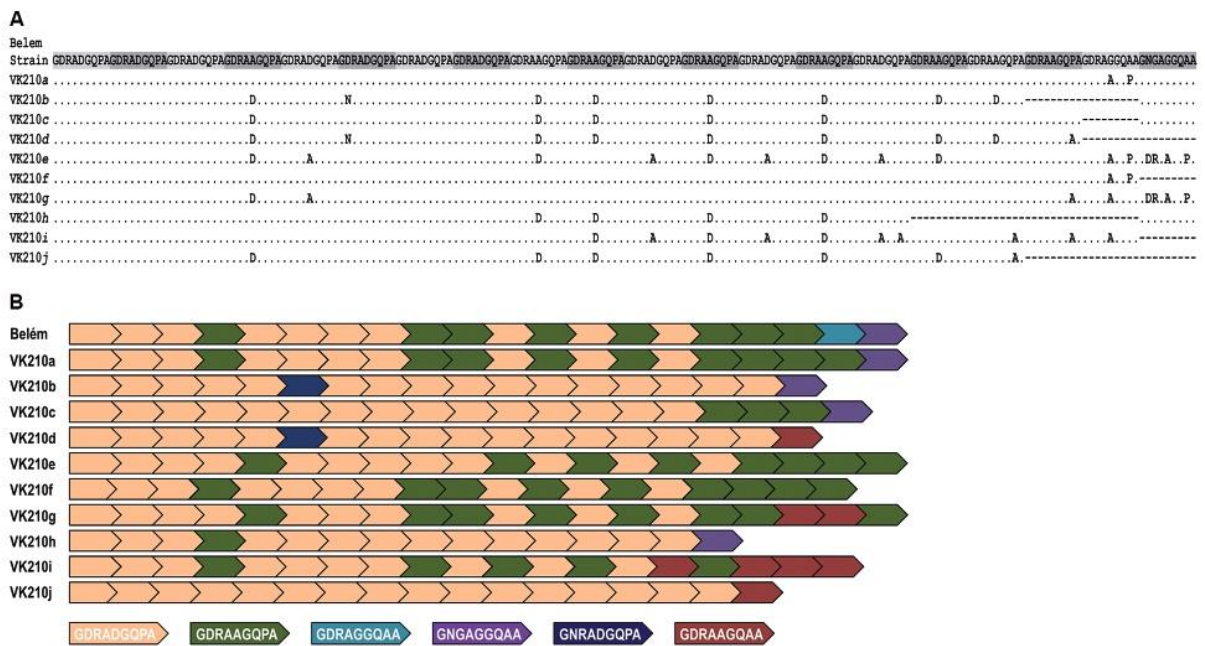


Fig. 2: amino acid sequence alignment for the central repetitive region (CRR) peptide encoded by the *csp* gene in the *Plasmodium vivax* isolates from Brazil with the VK210 variant. A: the isolates obtained from individuals residing in Manaus (state of Amazonas) were aligned with the Belém reference strain (GenBank: EU401923). Dots represent identical residues and dashes represent deletions. The sequences highlighted in gray are the units of CRR; B: schematic representation of the CRR. Different colours represent each of the six nonapeptide repeats found in VK210 subtypes.

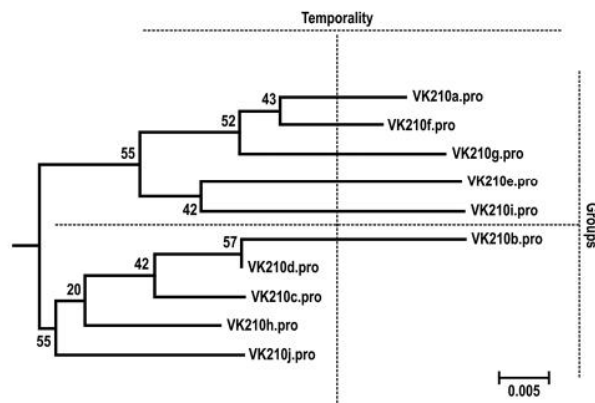


Fig. 3: neighbour-joining tree of the *Plasmodium vivax* isolates obtained from individuals residing in Manaus (state of Amazonas) based on the nucleotide sequence of the circumsporozoite protein central repetitive region (CRR). The bootstrap values are shown on the branches and indicate the number of times out of 100 resamplings.

seen to be higher.<sup>(23)</sup> Alternatively, it might also be due to the differential susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to infection with the *P. vivax* isolates<sup>(15)</sup> as previous studies have reported differences in the infectivity of the anophelines to the variants, indicating that *Anopheles darlingi* were more susceptible to infection by VK210.<sup>(24)</sup> We also cannot exclude the possibility that the lack of detection of the VK247 variant might be due to the low number of samples sequenced.

Individuals residing in malaria-endemic areas can be infected with genetically distinct parasite genotypes, which may result from either multiple infectious mosquito bites or bites from mosquitoes infected with multiple parasite genotypes. The complexity of the infections may also vary considerably based on the differences in the epidemiological scenarios. In low transmission areas, individuals may have infections with a single or a few parasite genotypes, while in high transmission areas, individuals may have infections with more than 10 genotypes.<sup>(25)</sup> In the present study, no mixed infection (VK210/VK247 or VK210/*P. vivax*-like) was observed in any of the analysed samples, which might reflect the low endemicity of the studied area as the frequency of mixed-clone infections has been correlated with the intensity of transmission. Competition of different strains for limited resources within a host during their life cycles may be important for survival, leading not only to higher transmissibility, but also an increase of the virulence and emergence of drug resistance.<sup>(26,27)</sup>

Insertions and deletions in CRR, resulting from either sexual recombination during meiosis or intrahelical strand-slippage events during mitotic DNA replication,<sup>(28)</sup> can generate novel CSP variants. Although only the VK210 variant has been found in the studied area, high genetic diversity in CRR was observed, resulting in 10 different VK210 subtypes, with the VK210a and VK210b subtypes being the most predominant ones. These VK210 subtypes varied in numbers and in the arrangements of five different nonapeptide sequences presented in the CRR. The nonapeptide sequences GDRADGQPA and

TABLE

Frequency of VK210 subtypes in *Plasmodium vivax* isolates obtained from individuals living in Manaus, state of Amazonas, Brazilian Amazon

VK210 subtype	n	%
VK210a	38	40
VK210b	19	20
VK210c	11	11,6
VK210d	7	7,4
VK210e	4	4,2
VK210f	7	7,4
VK210g	2	2,1
VK210h	4	4,2
VK210i	1	1
VK210j	2	2,1
Total	95	100

n: number of isolates presenting the corresponding VK210 subtype.

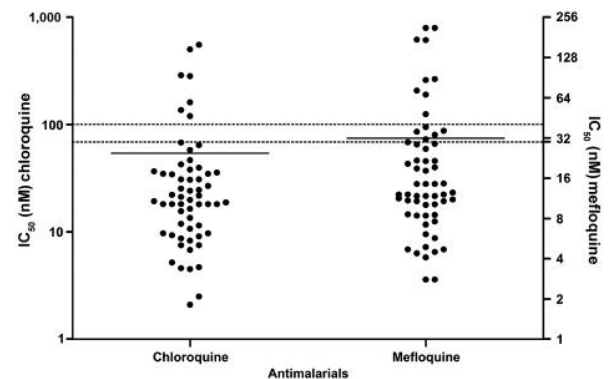


Fig. 4: distribution of 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values in *Plasmodium vivax* isolates for chloroquine and mefloquine using Deli-test. The values correspond to individual  $IC_{50}$  values. Lines represent geometric mean. The dotted line represents the resistance threshold for chloroquine (100 nM) and for mefloquine (30 nM).

GDRAAGQPA have also been observed in the *P. vivax* isolates from Sri Lanka, Azerbaijan, South Korea, Iran, Brazil, China, Philippines, Solomon Islands and Gabon; the nonapeptide GNGAGGQAA was found in *P. vivax* isolates from Sri Lanka, South Korea, Iran, Brazil, China, Philippines and Solomon Islands while the nonapeptides GNRADGQPA and GDRAAGQAA were described only in isolates from Brazil.<sup>(21,29)</sup>

The infection due to these CSP variants seems to influence factors such as symptom severity, humoral response patterns, parasite burden and cytokine balance.<sup>(10,17)</sup> However, the influence of these variants on drug response remains unclear. *P. vivax* isolates that are resistant to antimalarial drugs have been reported in several countries, including Brazil.<sup>(20)</sup> In a study conducted in Thailand, Kain et al.<sup>(17)</sup> suggested that the response to-

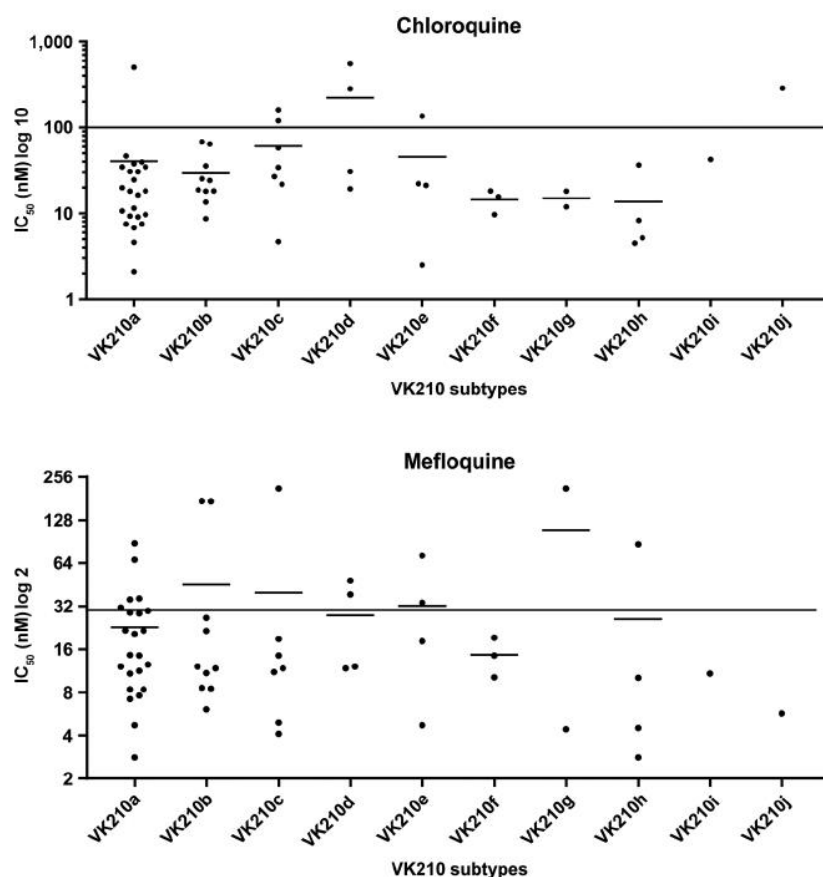


Fig. 5: distribution of 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values in *Plasmodium vivax* isolates for chloroquine and mefloquine using Deli-test according to VK210 subtypes. The values correspond to individual  $IC_{50}$  values. Lines represent the geometric mean. The continuous line represents the resistance threshold for chloroquine (100 nM) and mefloquine (30 nM)

wards chloroquine varies depending on the type of *P. vivax* as the VK210 variant and mixed infection VK210/VK247 took longer to clear, while VK247 tended to have a shorter duration. Later, a study conducted by Machado et al.<sup>(16)</sup> reported the correlation between the *P. vivax* variant and the response to chloroquine. Thus, we characterised the *P. vivax* CSP variants and subtypes in the isolates with different sensitivity profiles towards chloroquine and mefloquine, as determined using the colorimetric Deli test to evaluate whether the CSP variant can mark a *P. vivax* population with a distinct antimalarial resistance profile.

Overall, the  $IC_{50}$  values could be determined in 62% of *P. vivax* isolates collected in Manaus. *P. vivax* isolates showed a significant proportion of isolates with reduced sensitivity to chloroquine and mefloquine, 11.8 and 23.8%, respectively. The usefulness of the DELI test to generate results that can influence malaria control and public health policies has been demonstrated in a previous publication.<sup>(20)</sup> It is important to note that the *in vivo* outcome depends on several factors that cannot be evaluated *in vitro*, including the level of innate and acquired immunity. However, *in vitro* assays act as a preliminary warning system indicating a trend as the *in vitro* resistance may be indicative of clinical resistance.<sup>(20)</sup>

Temporal variation in the habitat of the pathogen may directly or indirectly aid in the selection of the genetic diversity,<sup>(30)</sup> and the genetic diversity of the *csp* gene has been associated with response to treatment as based on the infecting *P. vivax* CSP variant, there can be a difference in response towards chloroquine.<sup>(14,16)</sup> In this study, we investigated if the sensitivity towards chloroquine and mefloquine was associated with the VK210 subtypes, separated temporally (older or more recent isolates) or phylogenetically (individual or separated by groups). We did not observe any difference in the frequency of the resistant isolates and in the  $IC_{50}$  mean for chloroquine or mefloquine, according to VK210 subtypes. Similarly, we also did not observe any difference in the frequency of the resistant isolates and in the  $IC_{50}$  mean for chloroquine or mefloquine when the isolates were grouped temporally or separated by group. The data presented here indicated that the VK210 subtypes does not mark a *P. vivax* population with different profiles of sensitivity to antimalarial drugs.

A limiting factor of our study and data is the small number of samples used to determine the  $IC_{50}$  and, consequently, the small number of isolates profiled for decreased sensitivity and/or antimalarial resistance, which could explain VK247 and *P. vivax*-like variants not being detected in the studied samples.



The data reported here indicated that the VK210 variant is the most frequent subtype in this malaria-endemic area of the Brazilian Amazon and that there is great genetic variability in CRR of the *P. vivax* circumsporozoite protein. However, VK210 subtypes might not be a suitable marker for the different sensitivity profile of the *P. vivax* populations towards antimalarial drugs.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To all patients and individuals who participated in this study and for their cooperation and generous donation of blood, which made this study possible, to the sequencing platform of the Programa de Desenvolvimento Tecnológico de Produtos de Saúde (Program for Technological Development of Health Products – PDTIS/Fiocruz), for use of their facilities, to Gonzalo Bello Bentancor, for helping us with the phylogenetic analysis and for reading this manuscript, and to Heloisa Maria Nogueira Diniz, for her help with the figures.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

LRPR conceived and designed the study, performed the Deli-test, analysed the data and drafted the manuscript. JOF, DMB, LJMC, CTDR and RLDM helped in the conception and design of the study as well as reviewed the manuscript. BOB, VRT and DSPS carried out the genotype assays and analysed the data. EKPR, JCLJ, PRRT and CBJ helped in Deli-test and analysis. GCC and LSM helped in the molecular and data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

#### REFERENCES

- World Health Organization. World Malaria Report 2018 [Internet]. Geneva; 2018. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>.
- Secretaria de Vigilância em Saúde. Resumo epidemiológico por local de notificação. Datasus; 2016. Available from: <http://portal.saude.saude.gov.br>
- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16(10): 1611-14.
- Cabrera-Mora M, Fonseca JA, Singh B, Oliveira-Ferreira J, Lima-Junior JC, Calvo-Calle JM, et al. Induction of multifunctional broadly reactive T cell responses by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein recombinant chimera. *Infect Immun*. 2015; 83(9): 3749-61.
- Kappe SH, Buscaglia CA, Nussenzweig V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20(1): 29-59.
- Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Daniel Ribeiro CT, Goldberg AC, et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop*. 2004; 92(1): 63-9.
- Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Anea V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science*. 1985; 230(4727): 815-8.
- Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science*. 1989; 245(4921): 973-6.
- Qari SH, Shi YP, Goldman IF, Udhayakumar V, Alpers MP, Collins WE, et al. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. *Lancet*. 1993; 341(8848): 780-3.
- Souza-Neiras WC, Storti-Melo LM, Cassiano GC, Couto VS, Couto AA, Soares IS, et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? *Malar J*. 2010; 9: 178.
- González-Cerón L, Martínez-Barnette J, Montero-Solis C, Santillán F, Soto AM, Rodríguez MH, et al. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. *Malar J*. 2013; 12: 243.
- Machado RL, Póvoa MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94(4): 377-81.
- Gomes MSM, Vieira JLF, Cassiano GC, Musset Lise, Legrand E, Nacher M, et al. Evaluation of circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* to estimate its prevalence in Oiapoque, Amapá state, Brazil, bordering French Guiana. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2016; 58(1): 72.
- Ribeiro BP, Cassiano GC, de Souza RM, Cysne DN, Grisotto MA, de Azevedo dos Santos AP, et al. Polymorphisms in *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (CSP) influence parasite burden and cytokine balance in a pre-Amazon endemic area from Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3): e0004479.
- Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Nettel JC, Villarreal C, Kain KC, Hernandez JE. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in Southern Mexico. *Infect Immun*. 1999; 67(1): 410-12.
- Machado RL, de Figueiredo Filho AF, Calvosa VS, Figueiredo MC, Nascimento JM, Póvoa MM. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará state, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia. *Braz J Infect Dis*. 2003; 7(3): 175-7.
- Kain KC, Brown AE, Lanar DE, Ballou WR, Webster HK. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 49(4): 478-84.
- de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(7): 1125-6.
- Marques MM, Costa MR, Santana Filho FS, Vieira JL, Nascimento MT, Brasil LW, et al. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(1): 342-7.
- Pratt-Riccio LR, Chehuan YF, Siqueira MJ, das Graças Alecrim M, Bianco-Junior C, Druilhe P, et al. Use of a colorimetric (DELI) test for the evaluation of chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* to commonly used anti-plasmodial drugs in the Brazilian Amazon. *Malar J*. 2013; 12: 281.
- Patil A, Orjuela-Sánchez P, da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Evolutionary dynamics of the immunodominant repeats of the *Plasmodium vivax* malaria-vaccine candidate circumsporozoite protein (CSP). *Infect Genet Evol*. 2010; 10(2): 298-303.
- Santos EA, Primo DG, Supupira IMC, Cassiano GC, Barbosa DRL, Viana GMR et al. Frequency of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein genotypes in humans and anopheline mosquitoes in an endemic area of southeastern Pará state, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2016; 7(3): 57-64.
- Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND, Snounou G. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. *Trop Med Int Health*. 2006; 11(5): 729-37.
- da Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RN, Machado RLD, Póvoa MM. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(5): 547-50.

25. Bendixen M, Msangeni HA, Pedersen BV, Shayo D, Bodkar R. Diversity of *Plasmodium falciparum* populations and complexity of infections in relation to transmission intensity and host age: a study from the Usambara Mountains, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(2): 143-48.
26. Roode JC, Pansini R, Cheesman SJ, Helinski ME, Huijben S, Wargo AR. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(21): 7624-28.
27. Lee SA, Yeka A, Nsohya SL, Dokomajilar C, Rosenthal PJ, Talisuna A, et al. Complexity of *Plasmodium falciparum* infections and antimalarial drug efficacy at 7 sites in Uganda. *J Infect Dis.* 2006; 193(8): 1160-3.
28. McConkey GA, Waters AP, McCutchan TF. The generation of genetic diversity in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1990; 44(1): 479-98.
29. Dias S, Wickramarachchi T, Sahabandu I, Escalante AA, Udagama PV. Population genetic structure of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (Pvcsp) in Sri Lanka. *Gene.* 2013; 518(2): 381-7.
30. Lipsitch M, O'Hagan JJ. Patterns of antigenic diversity and the mechanisms that maintain them. *J R Soc Interface.* 2007; 4(16): 787-802.

## Anexo IX – Coautoria em artigo

***Plasmodium vivax* Ookinete Surface Protein (Pvs25) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon.**

Lana Bitencourt Chaves, Daiana de Souza Perce-da-Silva, Paulo Renato Rivas Totino, Evelyn Kety Pratt Riccio, **Barbara de Oliveira Baptista**, Ana Beatriz Lopes de Souza, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva, Ricardo Luiz Dantas Machado, Rodrigo Medeiros de Souza, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, Dalma Maria Banic, Lilian Rose Pratt-Riccio, Josué da Costa Lima-Junior.



Contents lists available at ScienceDirect

## Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

## *Plasmodium vivax* ookinete surface protein (Pvs25) is highly conserved among field isolates from five different regions of the Brazilian Amazon

Lana Bitencourt Chaves<sup>a</sup>, Daiana de Souza Perce-da-Silva<sup>b</sup>, Paulo Renato Rivas Totino<sup>b</sup>, Evelyn Kety Pratt Riccio<sup>b</sup>, Barbara de Oliveira Baptista<sup>b</sup>, Ana Beatriz Lopes de Souza<sup>b</sup>, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva<sup>a</sup>, Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>c</sup>, Rodrigo Medeiros de Souza<sup>d</sup>, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro<sup>b</sup>, Dalma Maria Banic<sup>e</sup>, Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>b</sup>, Josué da Costa Lima-Junior<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Pesquisa em Malária, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro Multidisciplinar, Universidade Federal do Acre, Campus Floresta, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Imunologia Clínica, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Malaria  
*Plasmodium vivax*  
Pvs25  
Genetic polymorphism  
Antigenicity  
Vaccine

## ABSTRACT

The *Plasmodium vivax* Ookinete Surface Protein (Pvs25) is one of the leading malaria Transmission-Blocking Vaccine candidates based on its high immunogenicity in animal models, transmission-blocking activity of antibodies elicited in clinical trials and high conservation among *P. vivax* isolates from endemic areas. However, the polymorphism in gene encoding Pvs25 in endemic areas from South America has been poorly studied so far. Here, we investigated the genetic polymorphism of *pvs25* in *P. vivax* isolates from five different regions of the Brazilian Amazon (*Cruzeiro do Sul*, *Mâncio Lima*, *Guajará*, *Manaus* and *Oiapoque*) and its impact on antigenicity of predicted B-cell epitopes using gene sequencing and epitope prediction tools. Firstly, only a non-synonymous substitution was found in the 657 bp amplified fragment in all sequenced samples, which represented an exchange of Gln by Lys at position 87 (Q87K) of protein amino acid sequence (domain II EGF-like). Q87K substitution was also present in all studied sites with a total frequency of 37.8%. *Cruzeiro do Sul* presented Q87K substitution in almost half of the isolates (48.4%), and an expressive frequency (40.5%) was also found in *Manaus*, while in *Mâncio Lima*, *Guajará* and *Oiapoque*, the frequencies were low (23.5%, 25% and 22.2% respectively). We also observed the Q87K mutation in a predicted B-cell epitope of *pvs25*, with no significant changes on its putative antigenicity. Our data suggest that the *pvs25* gene is conserved among isolates from different Brazilian Amazon geographic regions, an important observation considering the antigen potentiality as a vaccine candidate to cover distinct *P. vivax* endemic areas worldwide.

## 1. Introduction

Malaria is still an infectious parasitic disease of great epidemiological importance in several countries of tropical and subtropical regions of the world. Thus, it is extremely important to establish alternative intervention strategies capable of controlling malaria transmission, such as the development of an effective vaccine. The different cell stages developed by *Plasmodium* over its complex life cycle offer a myriad of antigenic targets that can be considered for vaccine design, including antigens expressed during sexual stage occurring in the mosquito vector (Bennink et al., 2016). In this context, transmission-

blocking vaccine (TBV) has been considered an important strategy for malaria control by acting directly against the sexual and sporogonic stages of malaria parasites (Kaslow, 1997) and, consequently, preventing mosquitoes from becoming infectious (Wu et al., 2015). Thus far, these suitable targets for TBV have generated promising results.

Different proteins from sexual stage have been characterized as TBV targets because antibodies against these proteins show transmission blocking activities (Sauerwein and Bousema, 2015). Among these vaccine candidates, the 25 kDa Ookinete Surface Protein (P25) has already been described in many *Plasmodium* species (Saxena et al., 2007). The P25 protein is specifically expressed on the surface of the

\* Corresponding author.

E-mail address: [josue@ioc.fiocruz.br](mailto:josue@ioc.fiocruz.br) (J.d.C. Lima-Junior).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.003>

Received 10 December 2018; Received in revised form 3 May 2019; Accepted 4 May 2019

Available online 08 May 2019

1567-1348/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

developing *Plasmodium* gametes, zygotes and ookinetes (Tsuboi et al., 1998). It is expressed before fertilization, reaching the peak of synthesis in the initial hours and later expressed in greater abundance on the surface of developing zygotes and ookinetes, being considered a post-activation target (del Carmen Rodriguez et al., 2000). This protein contains conserved structures, characterized by a secretory N-terminal signal sequence, four Epidermal Growth Factor (EGF)-like domains followed by a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor at the C-terminal end. It is also cysteine rich and highly constrained by up to 11 disulfide bonds (Kaslow et al., 1988). Although P25 protein function has not yet been fully recognized, in *P. berghei*, it has been demonstrated that P25 protein has multiple, and partially redundant properties during ookinete and oocyst development. The protein is essential for the survival of ookinetes in the mosquito midgut and subsequent penetration of the midgut epithelium, and transformation into oocyst (Tomas et al., 2001).

Diverse platforms using sexual stage antigens as vaccine candidates demonstrated antibodies with transmission blocking activity (Carter et al., 2000). The Pvs25 has been considered one promising TB vaccine in development against *P. vivax*, as specific antibodies induced in immunized mice or Aotus monkeys completely block the ability of *P. vivax* to infect *Anopheles* mosquitoes (Hisaeda et al., 2000; Arevalo-Herrera et al., 2005). In humans, recombinant Pvs25 was recognized by antibodies from exposed populations in Myanmar (Kim et al., 2011). Currently, only Pfs25 and its orthologous protein in *Plasmodium vivax*, Pvs25, have been tested in Phase Ia clinical trials, its generates transmission blocking immunity in humans demonstrating the potential of this antigen as a component of a transmission blocking vaccine (Wu et al., 2008; Malkin et al., 2005).

Differently from the extensive polymorphism commonly observed in several *Plasmodium* antigens, Pvs25 is considered conserved. Sequence analyses of *pvs25* revealed a similar structural organization though only 45% amino acid identity is observed (Tsuboi et al., 1998) and to date, genetic diversity of *pvs25* gene among different isolates has been surveyed in several Asian countries. However, no study on this polymorphism has been carried out in Brazilian malaria-endemic areas. A lack of understanding of *P. vivax* population structure and transmission dynamics is one of the key problems undermining effective malaria control. Population genetic studies are, therefore, important to define the diversity, distribution and dynamics of *P. vivax* populations, being important for contributing to malaria control interventions. In this study, we aimed to analyze the genetic diversity of *pvs25* gene in *P. vivax* isolates from different regions of the Brazilian Amazon.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study areas and blood sample collection

The study was carried out in five different regions of the Brazilian Amazon: *Cruzeiro do Sul*, *Mâncio Lima*, *Guajará*, *Manaus* and *Oiapoque* (Fig. 1). *Cruzeiro do Sul*, Acre State, located in the North Region of Brazil, with 82,622 inhabitants, presenting latitude of 07° 37' 52" and longitude of 72° 40' 12"; *Mâncio Lima*, Acre State, located in the North Region of Brazil, with 17,910 inhabitants, presenting latitude of 07° 36' 51" and longitude of 72° 53' 45"; *Guajará*, Amazonas State, with 14,074 inhabitants, presenting latitude of 2° 58' 19" and longitude of 57° 40' 39". The subset of *Manaus* and *Oiapoque* were previously described (Bitencourt Chaves et al., 2017).

Blood samples were collected from 98 *P. vivax*-infected individuals: 31 from *Cruzeiro do Sul*, 17 from *Mâncio Lima*, 4 from *Guajará*, 37 from *Manaus* and 9 individuals from *Oiapoque*. All *P. vivax* participants were enrolled according to the following criteria sought medical assistance for clinical malaria symptoms, presented uncomplicated malaria symptoms, were > 18 years of age, and had a positive *P. vivax* malaria diagnosis. Pregnant women, patients < 18 years of age, and *P. vivax*- and *P. falciparum*-infected individuals were excluded from the study.

Thin and thick blood smears were examined for the identification of the malaria parasite by a technician experienced in malaria diagnosis from the Brazilian Malaria Health Services. Thick blood smears from all the subjects were stained with Giemsa, and a total of 200 microscopic fields were examined under a 1000-fold magnification. Thin blood smears of the positive samples were examined for species identification. To increase the sensitivity of parasite detection, molecular analyses using specific primers for genus (*Plasmodium* sp) and species (*P. falciparum* and *P. vivax*) were performed in all the samples as previously described (Snounou et al., 1993). Donors positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated by the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

### 2.2. Ethics considerations

The study protocol of blood samples from *Cruzeiro do Sul*, *Mâncio Lima* and *Guajará* was reviewed and approved by the *Fundação Oswaldo Cruz* Research Ethics Committee, CEP-Fiocruz CAAE 46084015.1.0000.5248. In addition, the protocol of other blood sample collection was approved by the Research Ethics Committee of each locality: *Manaus* (CEP-Fiocruz): 346-613; *Oiapoque* (Hospital Municipal do Oiapoque/AP): 68980-000.

### 2.3. *P. vivax* DNA preparation and PCR amplification of *pvs25* gene

The DNA was extracted from blood samples using the QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol and, then, stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until amplification. All the *pvs25* genes reported in this study were amplified by conventional polymerase chain reaction (PCR) using the following pair of primers (5'-3'): Pvs25F2 5'-CACCGACCACAAAACTTAT-3' (AF083502, 158–177) and Pvs25R2 5'-AACGTAAAGCCTTCATACA-3' (AF083502, 814–795) described previously by Han et al., 2010 (Han et al., 2010). PCR reactions of the *pvs25* gene were carried out in 25  $\mu\text{L}$  volume that included 3  $\mu\text{L}$  of DNA, 10 pmol/ $\mu\text{L}$  of each primer and the Master Mix kit (Promega) containing Taq DNA polymerase, PCR buffer and 10 nmol of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP, Promega, Madison, WI USA). The conventional PCR reaction was carried out using a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem) and the amplification conditions were as follows: one step at  $95^{\circ}\text{C}$  for 2 min; 30 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 1 min,  $56^{\circ}\text{C}$  for 1 min and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min; and a last step at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Ten  $\mu\text{L}$  of amplified products were size-fractionated by electrophoresis within 1.5% agarose gel (Sigma) in  $1 \times$  TAE buffer (0.04 M TRIS-acetate, 1 mM EDTA) in the presence of  $1 \times$  GelRed nucleic acid stain (Biotium). PCR products were visualized by ultraviolet (UV) illumination. Sizing of products was performed using a GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Then, PCR fragments were purified using the GE Healthcare Lifesciences kit by following the manufacturer's instructions and sequenced.

### 2.4. DNA sequencing and polymorphism analysis

The specificity of the assay was confirmed by sequencing the PCR products from all positive samples using a Big Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The DNA sequencing was carried out in a 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) and the results were analyzed using DNASTAR's sequence alignment software to identify polymorphism against the reference strain: Sal-1 *pvs25* (AF083502) from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). For worldwide analysis, the following sequences were used: Mexico – GenBank: [ABS70906.1](#)-ABS70935.1; Iran – GenBank: [EU810766](#)-EU810774, [EU810766](#), [EU810767](#), [EU810768](#), [EU810769](#), [EU810770](#), [EU810771](#), [EU810772](#), [EU810773](#), [EU810774](#); India – GenBank: [HM048519](#)-HM048618, [FJ490913](#)-FJ490962, [JF824132](#)-[JF824147](#); Indonesia – GenBank: [AAV33639.1](#); North Korea: GenBank:

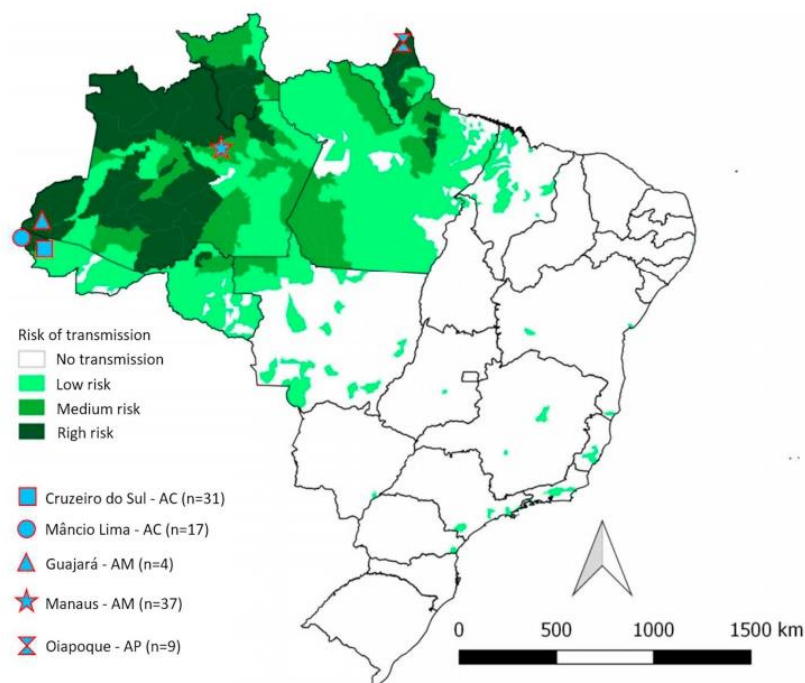


Fig. 1. Map showing the Malaria risk map by municipality of infection, Brazil, 2017 (SIVEP-Malaria).

AAV33640.1; South Korea: GenBank: GU971416-GU971611; Turkey: GenBank: ABG29073; Bangladesh – GenBank: BAA94348.1-BAA94350.1; Vietnam: GenBank: ABG29072; Thailand: GenBank: AB091729-AB091731.

### 2.5. Prediction of linear B-cell epitopes

Full-length protein sequence was subjected to BCPreds (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/predict.html>), a prediction algorithm based learning methods of the machine, with the default threshold (75%). All sequences predicted as linear B-cell epitope (20-mer) were evaluated to antigenicity of using the VaxiJen algorithm (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). This is the first server for alignment-independent prediction of protective antigens. It was developed to allow antigen classification solely based on the physicochemical properties of proteins without recourse to sequence alignment. The results page lists the selected target, the protein sequence, its prediction probability, and a statement of protective antigen or non-antigen, according to a predefined cutoff (Threshold 0.4). The impact of non-synonymous mutations in all predicted epitopes was evaluated comparing the overall score of reference sequence and mutated sequences.

### 2.6. Prediction of conformational B-cell epitopes

To predict the conformational B-cell epitopes we analyzed the crystal structure of Pvs25 from *Plasmodium vivax* Sal-1, obtained from Protein Databank (PDB: 1Z27). This structure was analyzed by ElliPro web server (<http://tools.iedb.org/elliPro/>), using its default values (Minimum score: 0.5; Maximum distance: 6 Å). This server ElliPro predicts linear and discontinuous antibody epitopes based on a protein antigen's 3D structure. This server associates each predicted epitope with a score, defined as a PI (Protrusion Index) value averaged over epitope residues. In the method, residues with larger scores are associated with greater solvent accessibility. Discontinuous epitopes are

defined based on PI values and are clustered based on the distance R (in Å between residue's centers of mass). The larger R is associated with the larger discontinuous epitopes being predicted. (Ponomarenko et al., 2008)

### 2.7. Statistical analysis

Sequences were aligned using CLUSTAL X2 and the number of segregation sites (S), number of haplotypes (h), haplotype diversity (Hd), average number of differences (K), nucleotide diversity ( $\pi$ ) were computed using DnaSP v6 (Rozaş et al., 2003). The Tajima's D test (Tajima, 1989) for determining departure from the predictions of the neutral theory of evolution was also estimated with DnaSP v6. The genetic differentiation between populations was investigated evaluating the rate of fixation ( $F_{ST}$ ) by analysis of molecular variance (AMOVA) implemented in ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010) and significances were estimated using 10,000 permutations. The significance level was adjusted by Bonferroni correction for multiple tests.

## 3. Results

### 3.1. Molecular characterization and sequence polymorphisms of the pvs25 gene

All *P. vivax* field isolates presented only one fragment corresponding to 657 base pair (bp). In addition to these samples, *P. falciparum* specimens were also tested, but proved negative for PCR amplification of the pvs25 gene. Thus, the 98 samples from individuals infected with *P. vivax* amplified by PCR were subjected to sequencing reactions to screen the possible single nucleotide polymorphisms of the gene encoding the Pvs25.

All 98 amplified fragments were sequenced and aligned for sequence analysis. Compared to reference sequence Sal-1 (AF083502), was not observed synonymous substitution, only one non-synonymous

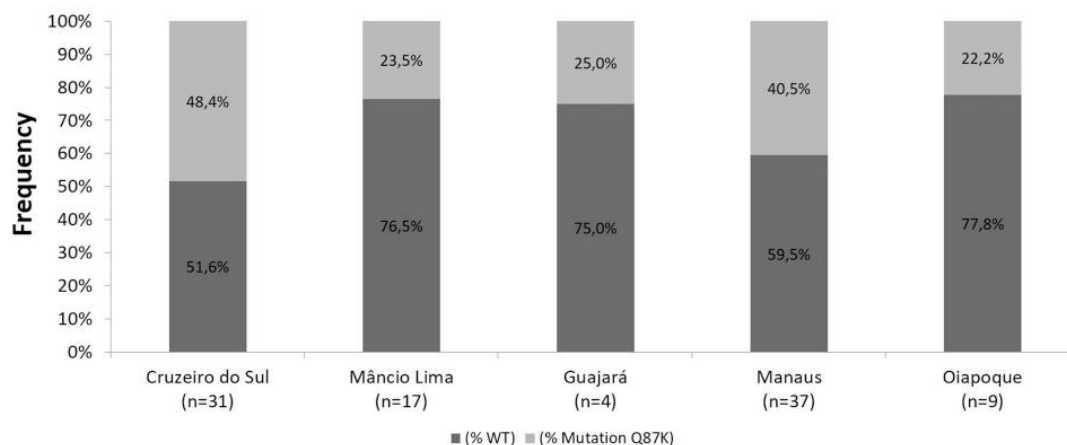


Fig. 2. Frequency of Q87K substitution in Pvs25 in *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon. The dark grey bar indicates the frequencies of wild type (compared with reference Sal-1 sequence) and the light grey bar indicates frequencies of the mutation Q87K.

substitution in the 657 bp amplified fragments was detected in all sequenced samples. The amino acid substitution Q87K, which represent the substitution of Gln to Lys at amino acid position 87 (EGF-like domain II), was identified with frequency of 37.8% of the isolates in the general population. In addition, regarding the areas studied, the substitution Q87K was present in *P. vivax* isolates collected in all localities. Despite being observed in all studied areas, the Q87K substitution was observed in higher frequencies in *Cruzeiro do Sul* (48.4%) and in *Manaus* (40.5%) when comparing with the frequencies observed in *Mâncio Lima* (23.5%), *Guajará* (25%) and *Oiapoque* (22.2%) (Fig. 2).

### 3.2. Population genetic analysis

The nucleotide diversity ( $\pi$ ) for *pvs25* of 98 sequences analyzed was 0.00091. The highest nucleotide diversity was observed in the Cruzeiro do Sul group (0.00099). Among all 5 populations, Mâncio Lima sequences displayed the lowest nucleotide diversity (0.00073) followed by the Oiapoque group (0.00074) (Table 1). Similarly, parasites from Cruzeiro do Sul presented the highest estimate of haplotype diversity (Hd) (0.51613) whereas parasites from Mâncio Lima showed the lowest Hd (0.38235). Haplotype diversity was similar among the other studied areas, followed by the Oiapoque (0.38889). The Tajima's D test was performed to assess if there is selective pressure on the *pvs25* gene. The Tajima's D values ranged between  $-0.61237$  and  $1.66806$ , tests showed no significant departures from neutrality in all studied areas, indicating no significant selection in the *pvs25* gene. Pairwise comparisons between each parasite population were performed using the  $F_{ST}$  statistics to check whether there was indicative of genetic differentiation between parasite populations, but all  $F_{ST}$  values were non-significant, suggesting lack of genetic differentiation between the studied populations (Table 2).

Table 1  
Comparison of genetic diversity among isolates from Brazil.

	No. of sequences	No. of segregating sites (S)	No. of haplotypes (h)	Haplotype diversity (Hd)	Average number of differences (K)	Nucleotide diversity ( $\pi$ )	Tajima's test (D)
Cruzeiro do Sul	31	1	2	0.51613	0.51613	0.00099	1.63773
Mâncio Lima	17	1	2	0.38235	0.38235	0.00073	0.56551
Guajará	4	1	2	0.50000	0.50000	0.00096	$-0.61237$
Manaus	37	1	2	0.49550	0.49550	0.00095	1.59494
Oiapoque	9	1	2	0.38889	0.38889	0.00074	0.15647
All samples	98	1	2	0.47486	0.47486	0.00091	1.66806

Statistical significance: Not significant,  $P > .10$ .

Table 2

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

	Cruzeiro do Sul	Mâncio Lima	Guajará	Manaus
Cruzeiro do Sul	–	–	–	–
Mâncio Lima	0.08591	–	–	–
Guajará	$-0.03279$	$-0.2$	–	–
Manaus	$-0.01784$	0.02444	$-0.0995$	–
Oiapoque	0.07847	$-0.09259$	$-0.23077$	0.01174

The  $F_{ST}$  values after Bonferroni correction.

### 3.3. Comparison of amino acid variations in Pvs25 among worldwide isolates

The Pvs25 amino acid substitutions identified in worldwide isolates including those from Brazilian Amazon are resumed in Table 3. Among a total of 17 variants of Pvs25 observed in *P. vivax* isolates worldwide, the I130T, mainly detected in Asian isolates, was the most common amino acid substitution. The Q87K substitution was present in our Brazilian isolates and in the North (Mexico) (Gonzalez-Ceron et al., 2010) and South American isolates (Colombia and Venezuela) (Escalante et al., 2005), as well as in Iran (Zakeri et al., 2009), Turkey [ABG29073] and Mauritania (Escalante et al., 2005). Amino acid residue E97Q was detected in some Asian isolates such as those from Iran (Zakeri et al., 2009), India (Prajapati et al., 2011), Indonesia (Escalante et al., 2005), South Korea (Han et al., 2010), China (Feng et al., 2011), Bangladesh (Tsuboi et al., 2004) and Thailand (Sattabongkot et al., 2003), but was not found in American isolates. The Q131K substitution was present in some Asia isolates as well as in Oceanian and Papua New Guinea (PNG) (Escalante et al., 2005). The other amino acid variants of the *pvs25* gene were found but were rare in the countries.

**Table 3**  
Comparison of amino acid variations in the *pvs25* gene of *P. vivax* isolates between Brazilian Amazon and worldwide isolates.

Isolates	SS	EGF-1		EGF-2		EGF-3				EGF-4				THR	Reference				
	2	35	38	87	97	130	131	132	137	138	149	170	174	183		196	198	199	
Brazilian Amazon	Sal-1	N	L	M	Q	E	I	Q	S	C	A	K	C	E	E	S	S	V	Tsuboi et al. (2004)
	Cruzeiro do Sul	.	.	.	Q/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Present study
	Mãncio Lima	.	.	.	Q/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	Guajará	.	.	.	Q/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	Manaus	.	.	.	Q/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
North America	Oiapoque	.	.	.	Q/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Gonzalez-Ceron et al. (2010)
	Mexico	.	.	.	Q/K	.	L/T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Central America	Nicaragua	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)	
	Honduras	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)	
	El Salvador	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)	
South America	Colombia	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)	
	Venezuela	.	.	T	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)	
Asia	Iran	.	.	.	Q/K	E/Q	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Zakeri et al. (2009)	
	India	.	.	.	E/Q	T	.	Q/K	.	C/W	A/G	.	.	E/K	E/K	S/F	S/T	V/E	Prajapati et al. (2011)
	Indonesia	.	.	.	.	Q	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)
	North Korea	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)
	South Korea	.	.	.	.	E/Q	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Han et al. (2010)
	China	.	L/M	.	.	E/Q	T	Q/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Feng et al. (2011)
	Turkey	.	.	.	K	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	ABG29073
	Bangladesh	.	.	.	.	E/K	T	Q/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Tsuboi et al. (2004)
	Vietnam	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	ABG29072
	Thailand	.	.	.	.	E/Q	T	Q/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Sattabongkot et al. (2003)
Oceanian	PNG	.	.	.	.	.	T	K	R	.	.	.	N	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)	
Africa	Mauritania	.	.	.	K	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Escalante et al. (2005)
Overall = 19 countries		2	35	38	87	97	130	131	132	137	138	149	170	174	183	196	198	199	
	Sal-1	N	L	M	Q	E	I	Q	S	C	A	K	C	E	E	S	S	V	
	N countries (with substitution)	1	1	1	7	7	13	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	(% Frequency)	5%	5%	5%	37%	37%	68%	26%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	

The amino acid variants of the *pvs25* gene were compared to reference Sal-1 sequence (AF083502). SS, secretary signal sequence; EGF, EGF-like domain; THR, the C terminal hydrophobic region. • Indicates identical amino acid residues compared to the Salvador-1 strain.

3.4. Polymorphisms and potential B-cell epitopes

For becoming a good TBV vaccine candidate, the antigen must be hydrophilic and produce a strong B-cell mediated immunity. Full-length proteins were first analyzed for B-cell linear epitopes prediction using BCPred and all predicted B-cell epitopes were listed (Fig. 3). Four sequences of 20-mers (Pvs25: L53-A72, I80-Y99, I139-A158, L161-Q180) were predicted as linear B-cell epitopes on BCPreds. These four predicted epitopes presented high values of VaxiJen Score, which corroborate with their antigenicity (Table 4). Besides, the analyze of Pvs25 from *P. vivax* Sal-1 (PDB: 1Z27) by Ellipro server reveals 3 potential conformational epitopes (Table 5). Interestingly, all predicted B-cell linear epitopes were contained in conformational epitopes (Fig. 4), corroborating their potential as antibody targets.

About the polymorphism in predicted immunogenic epitopes of Pvs25, only the sequence LSENTCEEKNECKKETLGGKA(Pvs25<sub>(L53-A72)</sub>) was not inserted in a polymorphic region of protein. The polymorphic

sequence described in Nicaragua (Escalante et al., 2005) (LKCNTDNEVRKNVEGVYKQ), containing the SNP C170R, presented a higher combination of BCPred and VaxiJen score (Mean Score: 1.06) of all sequences identified on epitope Pvs25<sub>(L161-Q180)</sub>. All polymorphic sequences identified on Pvs25 that were inserted in predicted epitopes presented no significant changes on predicted score (Table 4). Unfortunately, we cannot precise the real effect of mutations on structure and antigenicity of Pvs25 conformational epitopes, once that algorithms to identify these epitopes are dependents of 3D structure, which were only crystallographic to Pvs25 from *P. vivax* Sal-1. Despite this, in Fig. 4, we showed the location of predicted conformational epitopes and identified SNPs in 3D structure of Pvs25.

4. Discussion

Pvs25 is considered one important Transmission-Blocking Vaccine candidate. This protein is essential for the survival of ookinetes in the

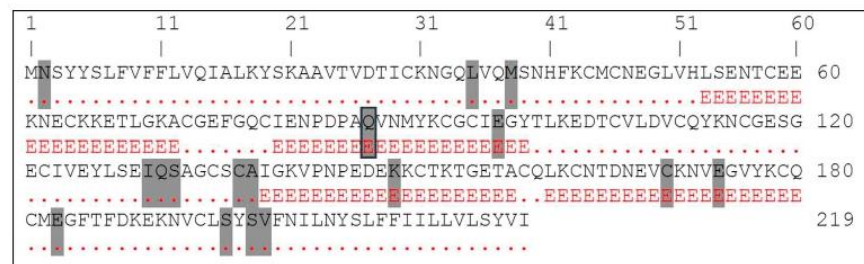


Fig. 3. B-cell epitope mapping of Pvs25 (Salvador Strain) using BCPreds and VaxiJen. Predicted epitopes were represented by letter E, non-predicted epitopes represented by red dots and grey bars indicate the polymorphic sites found in our sequences and sequences available in database from malaria endemic areas worldwide. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Table 4**  
Influence of polymorphisms in predicted B cell epitopes.

Epitope	Sequence	Epitope	BCPred score	VaxiJen score	Mean score
Pvs25 <sub>(L53-A72)</sub>	Sal-1	LSENTCEEKNECKKETLGKA	1.00	1.20	1.10
Pvs25 <sub>(I80-Y99)</sub>	Sal-1	IENPDPAQVNMVYKCGCIEGY	0.95	0.65	0.80
	Q87K	IENPDPAQVNMVYKCGCIEGY	0.95	0.70	0.82
	E97Q	IENPDPAQVNMVYKCGCIQGY	0.93	0.62	0.77
	Q87K; E97Q	IENPDPAQVNMVYKCGCIQGY	0.92	0.67	0.79
	Sal-1	IGKVPNPEDEKCKTKTGETA	1.00	1.44	1.22
Pvs25 <sub>(I139-A158)</sub>	K149 N	IGKVPNPEDEKCKTKTGETA	1.00	1.27	1.14
	Sal-1	LKCNTDNEVCNKVEGVYKQ	0.95	0.76	0.85
Pvs25 <sub>(L161-Q180)</sub>	C170R	LKCNTDNEVRKNVEGVYKQ	0.97	1.15	1.06
	E174K	LKCNTDNEVCNKVEGVYKQ	0.86	0.81	0.84

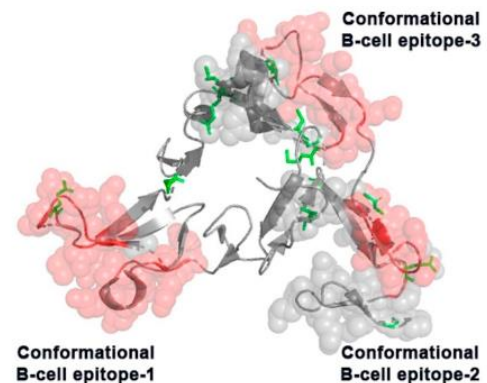
The scores of BCPred and VaxiJen were listed to predicted epitopes (Pvs25<sub>L53-A72</sub>, Pvs25<sub>I80-Y99</sub>, Pvs25<sub>I139-A158</sub> and Pvs25<sub>L161-Q180</sub>). Sequences containing polymorphism inserted on predicted epitopes (Q87K, E97Q, C170R and E174K) were listed with their respective values of BCPred and VaxiJen scores. The “Mean score” represent the mean value between BCPred and VaxiJen.

Bold signifies the Sequences predicted as B-cell linear epitopes and inserted in conformational epitopes

mosquito midgut, penetration of the epithelium and transformation into oocysts (Tomas et al., 2001). However, the outstanding ability of *Plasmodium* in generating polymorphisms can culminate in immune evasion (Zakeri et al., 2009), which represents one of the major challenges for the development of a globally effective vaccine. Thus, one important strategy for malaria vaccine development is the identification and use of relatively conserved *Plasmodium* antigens. Therefore, identifying sequence variations in these candidate antigens may be helpful in designing an effective anti-malarial vaccine. Considering that the knowledge about the genetic polymorphism of *pvs25* in Brazilian Amazon areas remains unknown, we aimed to analyze this genetic diversity and to evaluate its potential impact in potential B-cell epitopes.

In our study, all the 98 field isolates from five different localities presented only one PCR fragment corresponding to 657 bp as seen in previous studies in other localities (Han et al., 2010). Sequencing analysis revealed that only Q87K substitution was found in the Brazilian isolates when comparing with reference Sal-1 strain. However, no work had yet been done in such diverse Brazilian endemic areas, and this is the first time that this mutation is described in *P. vivax* isolates from regions of east, middle and west of the Brazilian Amazon. The polymorphism was observed in all studied locations and the frequencies presented no statistical difference between the studied localities. In addition, this non-synonymous mutation has been previously reported in studies conducted in North (Mexico) (Gonzalez-Ceron et al., 2010) and South (Colombia and Venezuela) American isolates (Escalante et al., 2005) as also Iran (Zakeri et al., 2009), Turkey [ABG29073] and Mauritania (Escalante et al., 2005). Interestingly, in South America, the wild type genotype was found only in our studied areas. However, in sequences available worldwide, the Q and K genotypes at position 87 were also observed in isolates from Iran (Zakeri et al., 2009). This finding can corroborate the evidences that *P. vivax* in the Americas does not result from a single introduction into the continent (Taylor et al., 2013), and that some of the American haplotypes could derive from Asian populations (Comejo and Escalante, 2006; Culleton et al., 2011).

In order to compare our findings with the Pvs25 sequences around



**Fig. 4.** Conformational epitopes and identified mutations in Pvs25 – 3D structure. Pvs25 representation as cartoon (grey), in which predicted conformational epitopes were represented by spheres. Predicted linear B-cell epitopes were located in conformational epitopes and were signaled by red spheres. Identified SNPs were represented by green sticks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the world, we also considered the frequencies of mutations in all continents. Despite the Q87K mutation is present in 5 out of 7 regions studied, the overall distribution of Pvs25 non-synonymous polymorphism was not restricted to this mutation. The comparison of our data and sequences available showed at list 17 variants in Pvs25 sequences observed in worldwide isolates. The frequencies of Pvs25 polymorphism in different countries ranged from 5% to 68%, being I130T (68%), Q87K (37%) and E97Q (37%) the most frequent polymorphism found globally. These data corroborate the studies of Chaurio et al., which suggested that some parasite haplotypes may have

**Table 5**  
Conformational B-cell epitopes on Pvs25.

Epitope	Residues	Number of residues	Ellipro score
1	<b>K39, N40, E41, C42, K43, K44, E45, T46, L47, G48, K49, C57, I58, E59, N60, P61, D62, P63, A64, Q65, V66, N67, M68, Y69, K70</b>	25	0.785
2	<b>T3, V4, D5, T6, L139, K140, C141, N142, T143, D144, N145, E146, V147, K149, Q158, C159, M160, E161, G162, F163, T164, F165, D166, K167, E168, K169, N170, V171, C172, L173, G174, P175</b>	32	0.679
3	<b>K92, N93, C94, G95, E96, S97, E103, Y104, L105, S106, E107, I108, Q109, S110, A111, A116, I117, G118, K119, V120, P121, N122, P123, E124, D125, E126, K127, K128, C129, T130, K131, T132, G133, E134, T135</b>	35	0.667

Mers that compound each Conformational epitope were listed as residues, where the letter indicates the one letter code of amino acid, and the number indicates the position of residue in the sequence. Sequences predicted as B-cell linear epitopes and inserted in conformational epitopes were highlighted by bold letters.

different geographic clusters (Chaurio et al., 2016). Moreover, even with good conservation rates, *pvs25* showed higher genetic variability compared to other sexual stage antigens reported in *P. vivax* as *pvs48/45* and the Willebrand factor A domain-related protein (WARP) (Chaurio et al., 2016), but lower polymorphisms when compared to well established vaccine candidates against sporozoites and merozoites, such as CSP and AMA-1 (Takala et al., 2009).

As observed in previous studies (Feng et al., 2011; Han et al., 2010), the EGF2 and EGF3 sites presented higher variability, and most conserved areas were located at EGF1 and EGF4 domains. Interestingly, Pvs25 the EGF2 and EGF3 like domains have been already described as sites targeted for blocking antibodies (Saxena et al., 2006). In addition, the EGF-like domains in the orthologous protein Pfs25 have also shown immune blocking activity, indicating that the EGF2 domain might be a good target for TBV. Considering that an epitope corresponding to the B-cell receptor plays an important role in vaccine design aiming at antibody production, full-length Pvs25 were analyzed to determine whether SNPs in Pvs25 antigen are involved in antigenic regions and the potential impact of all observed polymorphisms in predicted B-cell epitopes. The four linear B-cell epitopes predicted in Pvs25 presented conservation degrees ranging from 90 to 95% between the epitope sequences of isolates and reference strain. However, only Pvs25<sub>(L153-A72)</sub> was fully conserved among our isolates, while the epitopes Pvs25<sub>(I80-Y99)</sub>, Pvs25<sub>(I139-A158)</sub> and Pvs25<sub>(L161-Q180)</sub> presented similar prediction scores for reference and mutant epitopes. However, we cannot estimate the real effect of identified mutations in the recognition or affinity of specific antibodies against Pvs25, mainly due the low number of known monoclonal antibodies against Pvs25 of *P. vivax*. Besides, the observation that all mutate epitopes were still predicted as immunogenic suggest that, beyond the low selective pressure in this immunogenic regions and the limited polymorphism of TBV candidates compared to target antigens expressed in asexual stage parasites (Barry et al., 2009; Tsuboi et al., 1998; Kaslow et al., 1989; Shi et al., 1992). In fact, during this sexual stage, the expressed proteins may adapt to diverse micro-environments into the human and mosquito hosts where parasites have to go through in order to complete their life cycle (Moreno-Garcia et al., 2014). It is also important to mention, that for *P. vivax* sexual antigens, the exposure to the immune system is expected to be longer than in *P. falciparum* due to the early appearance of *P. vivax* gametocytes in circulation (Vallejo et al., 2016). However, this increased exposure does not seem to result in relevant Pvs25 polymorphism (as a potential evasion mechanism) in response to a selective pressure exerted by the immune response to Pvs25, since the protein remains relatively conserved and immunogenic under natural conditions (Kim et al., 2011).

In summary, the present study explored the genetic polymorphism of *pvs25*, uncovered the amino acid substitution at the protein among Brazilian Amazon isolates and the frequent amino acid substitutions observed shared by American isolates. Despite the observed amino acid changes in natural populations worldwide, the antibody targets may not be significantly affected, since the genetic diversity of the Pvs25 vaccine candidate observed globally is limited and the predicted antigenicity was preserved.

#### Acknowledgments

We are grateful to all individuals who participated in this study for their cooperation and generous donation of blood, which made this study possible. We are also indebted to the sequencing platform of the Program for Technological Development of Health Products (PDTIS-Fiocruz) for use of their facilities. To Marcelo Urbano Ferreira, for the critical revision of the manuscript. CTDR, RLDLM, JCLJ, received a “Research Productivity Fellowship” from the Brazilian National Research Council (CNPq) and CTDR and JCLJ are recipients of a grant from Faperj as *Cientista do Nosso Estado* and *Jovem Cientista do Nosso Estado*, respectively. This work was also funded by Inovabio grant program (BIO-004-FIO-17-2-11 – Bio-Manguinhos/Fiocruz).

#### Author's contribution

Conceptualization: JdCLJ, LBC, DMB, LRPR.  
 Formal analysis: LBC, JdCLJ, RNRdS.  
 Investigation: LBC, DdSPdS, RNRdS.  
 Methodology: LBC, RNRdS, DdSPdS, BdOB, ABLs.  
 Resources: DMB, RLDLM, PRRT, RMdS, CTDR, EKPR, JdCLJ.  
 Writing – original draft: LBC, JdCLJ, RNRdS, CTDR.  
 Writing – review & editing: DdSPdS, LRPR, RLDLM, DMB, PRRT, EKPR, CTDR and RMdS.

#### References

- Arevalo-Herrera, M., Solarte, Y., Yasnot, M.F., Castellanos, A., Rincon, A., Saul, A., Mu, J., Long, C., Miller, L., Herrera, S., 2005. Induction of transmission-blocking immunity in Aotus monkeys by vaccination with a *Plasmodium vivax* clinical grade PVS25 recombinant protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 32–37.
- Barry, A.E., Schultz, L., Buckee, C.O., Reeder, J.C., 2009. Contrasting population structures of the genes encoding ten leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 4, e8497.
- Bennink, S., Kiesow, M.J., Pradel, G., 2016. The development of malaria parasites in the mosquito midgut. *Cell. Microbiol.* 18, 905–918.
- Bitencourt Chaves, L., Perce-da-Silva, D.S., Rodrigues-da-Silva, R.N., Martins da Silva, J.H., Cassiano, G.C., Machado, R.L., Pratt-Riccio, L.R., Banic, D.M., Lima-Junior, J.D., 2017. *Plasmodium vivax* cell traversal protein for Ookinetes and Sporozoites (PvcETOS) gene sequence and potential epitopes are highly conserved among isolates from different regions of Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005344.
- Carter, R., Mendis, K.N., Miller, L.H., Molineaux, L., Saul, A., 2000. Malaria transmission-blocking vaccines—how can their development be supported? *Nat. Med.* 6, 241–244.
- Chaurio, R.A., Pacheco, M.A., Cornejo, O.E., Durrego, E., Stanley Jr., C.E., Castillo, A.I., Herrera, S., Escalante, A.A., 2016. Evolution of the transmission-blocking vaccine candidates Pvs28 and Pvs25 in *Plasmodium vivax*: geographic differentiation and evidence of positive selection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004786.
- Cornejo, O.E., Escalante, A.A., 2006. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol.* 22, 558–563.
- Culleton, R., Coban, C., Zeyrek, F.Y., Cravo, P., Kaneko, A., Randrianarivelojosia, M., Andriananjaka, V., Kano, S., Farnert, A., Arez, A.P., Sharp, P.M., Carter, R., Tanabe, K., 2011. The origins of African *Plasmodium vivax*; insights from mitochondrial genome sequencing. *PLoS One* 6, e29137.
- del Carmen Rodriguez, M., Gerold, P., Dessens, J., Kurtenbach, K., Schwartz, R.T., Sinden, R.E., Margos, G., 2000. Characterisation and expression of pbs25, a sexual and sporogonic stage specific protein of *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 147–159.
- Escalante, A.A., Cornejo, O.E., Freeland, D.E., Poe, A.C., Durrego, E., Collins, W.E., Lal, A.A., 2005. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1980–1985.
- Excoffier, L., Lischer, H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
- Feng, H., Zheng, L., Zhu, X., Wang, G., Pan, Y., Li, Y., Yang, Y., Lin, Y., Cui, L., Cao, Y., 2011. Genetic diversity of transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 in *Plasmodium vivax* isolates from Yunnan Province, China. *Parasit. Vectors* 4, 224.
- Gonzalez-Ceron, L., Alvarado-Delgado, A., Martinez-Barnette, J., Rodriguez, M.H., Ovilla-Munoz, M., Perez, F., Hernandez-Avila, J.E., Sandoval, M.A., Rodriguez Mdel, C., Villarreal-Trevino, C., 2010. Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from southern Mexico and their association to local anophelines infectivity. *Infect. Genet. Evol.* 10, 645–654.
- Han, E.T., Lee, W.J., Sattabongkot, J., Jang, J.W., Nam, M.H., An, S.S., Suh, I., Lim, C.S., 2010. Sequence polymorphisms of *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins (Pvs25 and Pvs28) from clinical isolates in Korea. *Tropical Med. Int. Health* 15, 1072–1076.
- Hisaeda, H., Stowers, A.W., Tsuboi, T., Collins, W.E., Sattabongkot, J.S., Suwanabun, N., Torii, M., Kaslow, D.C., 2000. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect. Immun.* 68, 6618–6623.
- Kaslow, D.C., 1997. Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *Int. J. Parasitol.* 27, 183–189.
- Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F., Miller, L.H., 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* 333, 74–76.
- Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Keister, D.B., 1989. Minimal variation in a vaccine candidate from the sexual stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32, 101–103.
- Kim, T.S., Kim, H.H., Kim, J.Y., Kong, Y., Na, B.K., Lin, K., Moon, S.U., Kim, Y.J., Kwon, M.H., Sohn, Y., Kim, H., Lee, H.W., 2011. Comparison of the antibody responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* antigens in residents of Mandalay, Myanmar. *Malar. J.* 10, 228.
- Malkin, E.M., Durbin, A.P., Diemert, D.J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., Long, C.A., Lambert, L., Miles, A.P., Wang, J., Stowers, A., Miller, L.H., Saul, A., 2005. Phase I vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 23, 3131–3138.
- Moreno-Garcia, M., Recio-Totoro, B., Claudio-Piedras, F., Lanz-Mendoza, H., 2014. Injury and immune response: applying the danger theory to mosquitoes. *Front. Plant Sci.* 5,

- 451.
- Ponomarenko, J., Bui, H.H., Li, W., Füsseder, N., Bourne, P.E., Sette, A., Peters, B., 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinforma.* 9, 514.
- Prajapati, S.K., Joshi, H., Dua, V.K., 2011. Antigenic repertoire of *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccine candidates from the Indian subcontinent. *Malar. J.* 10, 111.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Sattabongkot, J., Tsuboi, T., Hisaeda, H., Tachibana, M., Suwanabun, N., Rungruang, T., Cao, Y.M., Stowers, A.W., Sirichaisinthop, J., Coleman, R.E., Torii, M., 2003. Blocking of transmission to mosquitoes by antibody to *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 despite antigenic polymorphism in field isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 536–541.
- Sauerwein, R.W., Bousema, T., 2015. Transmission blocking malaria vaccines: assays and candidates in clinical development. *Vaccine* 33, 7476–7482.
- Saxena, A.K., Singh, K., Su, H.P., Klein, M.M., Stowers, A.W., Saul, A.J., Long, C.A., Garboczi, D.N., 2006. The essential mosquito-stage P25 and P28 proteins from *Plasmodium* form tile-like triangular prisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 90–91.
- Saxena, A.K., Wu, Y., Garboczi, D.N., 2007. Plasmodium p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines. *Eukaryot. Cell* 6, 1260–1265.
- Shi, Y.P., Alpers, M.P., Pova, M.M., Lal, A.A., 1992. Single amino acid variation in the ookinete vaccine antigen from field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 179–180.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X.P., Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V.E., Thaithong, S., Brown, K.N., 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 315–320.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Takala, S.L., Coulibaly, D., Thera, M.A., Batchelor, A.H., Cummings, M.P., Escalante, A.A., Ouattara, A., Traore, K., Niangaly, A., Djimde, A.A., Doumbo, O.K., Plowe, C.V., 2009. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci. Transl. Med.* 1, 2ra5.
- Taylor, J.E., Pacheco, M.A., Bacon, D.J., Beg, M.A., Machado, R.L., Fairhurst, R.M., Herrera, S., Kim, J.Y., Menard, D., Pova, M.M., Villegas, L., Mulyanto, A., Snounou, G., Cui, L., Zeyrek, F.Y., Escalante, A.A., 2013. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2050–2064.
- Tomas, A.M., Margos, G., Dimopoulos, G., van Lin, L.H., de Koning-Ward, T.F., Sinha, R., Lupetti, P., Beetsma, A.L., Rodriguez, M.C., Karras, M., Hager, A., Mendoza, J., Butcher, G.A., Kafatos, F., Janse, C.J., Waters, A.P., Sinden, R.E., 2001. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J.* 20, 3975–3983.
- Tsuboi, T., Kaslow, D.C., Gozar, M.M., Tachibana, M., Cao, Y.M., Torii, M., 1998. Sequence polymorphism in two novel *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. *Mol. Med.* 4, 772–782.
- Tsuboi, T., Kaneko, O., Cao, Y.M., Tachibana, M., Yoshihiro, Y., Nagao, T., Kanbara, H., Torii, M., 2004. A rapid genotyping method for the vivax malaria transmission-blocking vaccine candidates, Pvs25 and Pvs28. *Parasitol. Int.* 53, 211–216.
- Vallejo, A.F., Garcia, J., Amado-Garavito, A.B., Arevalo-Herrera, M., Herrera, S., 2016. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar. J.* 15, 48.
- Wu, Y., Ellis, R.D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E.M., Mahanty, S., Fay, M.P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A.P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., Miller, L.H., Durbin, A.P., 2008. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* 3, e2636.
- Wu, Y., Sinden, R.E., Churcher, T.S., Tsuboi, T., Yusibov, V., 2015. Development of malaria transmission-blocking vaccines: from concept to product. *Adv. Parasitol.* 89, 109–152.
- Zakeri, S., Razavi, S., Djadid, N.D., 2009. Genetic diversity of transmission blocking vaccine candidate (Pvs25 and Pvs28) antigen in *Plasmodium vivax* clinical isolates from Iran. *Acta Trop.* 109, 176–180.

## **Anexo X – Coautoria em artigo**

**Antibody responses against *Plasmodium vivax* TRAP recombinant and synthetic antigens in naturally exposed individuals from the Brazilian Amazon.**

Ada da Silva Matos, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva, Isabela Ferreira Soares, **Barbara de Oliveira Baptista**, Rodrigo Medeiros de Souza, Lana Bitencourt-Chaves, Paulo Renato Rivas Totino, Juan Camilo Sánchez-Arcila, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, César López-Camacho, Arturo Reyes-Sandoval, Lilian Rose Pratt-Riccio, Josué da Costa Lima-Junior.



# Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals From the Brazilian Amazon

Ada da Silva Matos<sup>1</sup>, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva<sup>2</sup>, Isabela Ferreira Soares<sup>1</sup>, Barbara de Oliveira Baptista<sup>3</sup>, Rodrigo Medeiros de Souza<sup>4</sup>, Lana Bitencourt-Chaves<sup>1</sup>, Paulo Renato Rivas Totino<sup>3</sup>, Juan Camilo Sánchez-Arcila<sup>5</sup>, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro<sup>3</sup>, César López-Camacho<sup>6</sup>, Arturo Reyes-Sandoval<sup>6</sup>, Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>3</sup> and Josué da Costa Lima-Junior<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Huji Xu,  
Tsinghua University, China

### Reviewed by:

Adrian John Frederick Luty,  
Institut de Recherche Pour le  
Développement (IRD), France  
Takaŋumi Tsuboi,  
Ehime University, Japan

### \*Correspondence:

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

### Specialty section:

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

**Received:** 23 May 2019

**Accepted:** 03 September 2019

**Published:** 20 September 2019

### Citation:

Matos AS, Rodrigues-da-Silva RN,  
Soares IF, Baptista BO, de Souza RM,  
Bitencourt-Chaves L, Totino PRR,  
Sánchez-Arcila JC, Daniel-Ribeiro CT,  
López-Camacho C,  
Reyes-Sandoval A, Pratt-Riccio LR  
and Lima-Junior JC (2019) Antibody  
Responses Against *Plasmodium vivax*  
TRAP Recombinant and Synthetic  
Antigens in Naturally Exposed  
Individuals From the Brazilian Amazon.  
*Front. Immunol.* 10:2230.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.02230

<sup>1</sup> Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup> Laboratory of Monoclonal Antibodies Technology, Institute of Immunobiology Technology, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup> Laboratory of Malaria Research, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>4</sup> Centre for Health Sciences and Sport, Federal University of Acre (UFAC), Cruzeiro Do Sul, Brazil, <sup>5</sup> Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, IOC, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>6</sup> Nuffield Department of Medicine, The Jenner Institute, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) is essential for sporozoite motility and the invasion of mosquitoes' salivary gland and vertebrate's hepatocyte and is, thus, considered a promising pre-erythrocytic vaccine candidate. Despite the existence of a few reports on naturally acquired immune response against *Plasmodium vivax* TRAP (PvTRAP), it has never been explored so far in the Amazon region, so results are conflicting. Here, we characterized the (IgG and IgG subclass) antibody reactivity against recombinant PvTRAP in a cross-sectional study of 299 individuals exposed to malaria infection in three municipalities (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima and Guajará) from the Acre state of the Brazilian Amazon. In addition, the full PvTRAP sequence was screened for B-cell epitopes using *in silico* and *in vitro* approaches. Firstly, we confirmed that PvTRAP is naturally immunogenic in the cohort population since 49% of the individuals were IgG-responders to it. The observed immune responses were mainly driven by cytophilic IgG1 over all other subclasses and the IgG levels that was correlated with age and time of residence in the studied area ( $p < 0.05$ ). Interestingly, only the levels of specific anti-TRAP IgG3 seemed to be associated with protection, as IgG3 responders presented a significantly higher time elapse since the last malaria episode than those recorded for IgG3 non-responders. Regarding the B-cell epitope mapping, among the 148 responders to PvTRAP, four predicted epitopes were confirmed by recognition of antibodies (PvTRAP<sub>R197-H227</sub>; PvTRAP<sub>E237-T258</sub>; PvTRAP<sub>P344-G374</sub>; and PvTRAP<sub>E439-K454</sub>). Nevertheless, the frequency of responders against these peptides were low and did not show a clear correlation with the antibody response against the corresponding antigen.

Moreover, none of the linear confirmed epitopes were located in the binding regions of PvTRAP in respect to the host cell ligand. Collectively, our data confirm the PvTRAP immunogenicity among Amazon inhabitants, while suggesting that the main important B-cell epitopes are not linear.

**Keywords:** malaria, *Plasmodium vivax*, PvTRAP, humoral immune response, epitope mapping

## INTRODUCTION

Malaria is caused by parasites belonging to the *Plasmodium* genus. Two species are considered the main etiological agents: *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* (1). *P. falciparum* is more prevalent in Africa and is responsible for most cases of death around the world, and *P. vivax* is prevalent in the Americas (2). Despite several pre-clinical and a few clinical trials aiming for a global *P. vivax* vaccine development, there is still no licensed vaccine available.

The leading vaccine candidates against *P. vivax* are designed to tackle the pre-erythrocytic stage of lifecycle, and the sporozoite protein TRAP (*thrombospondin-related adhesive protein*) has been considered a promising candidate antigen. TRAP is a highly conserved transmembrane *Plasmodium* protein belonging to the TRAP/Micronemal protein 2 family (TRAP / MIC2). It is required for sporozoite motility and, in conjunction with the circumsporozoite (CS) protein, is essential for sporozoite invasion in the salivary gland of the mosquito and vertebrate hepatocytes (3, 4). Structurally, TRAP contains an N-terminal hydrophobic sequence (domain I), an integrin A-type magnesium binding Domain (domain II), a thrombospondin type I replications (domain III), an acid proline/asparagine domain region (IV), a hydrophobic transmembrane domain (V domain), and a cytoplasmic tail region (5). Sporozoite locomotion is mediated by the subpellicular actomyosin system that binds to the cytoplasmic tail of TRAP (6). Despite the functional importance of TRAP in parasite survival, analysis of *P. falciparum* TRAP (PfTRAP) and *P. vivax* (PvTRAP) loci of clinical isolates revealed a small sequence heterogeneity (7).

The potential of TRAP as vaccine antigen is currently supported by several reports of immunogenicity and protection in mice, non-human primates and humans. For instance, in a murine model, co-immunization of CSP with TRAP provided complete protection against a parasite challenge, whereas vaccination using only CSP provided only partial protection (8). In monkeys, immunization with synthetic peptides representing domain II of PvTRAP was able to protect 2/3 of the challenged animals with *P. vivax* sporozoites (9). In humans, Phase IIa clinical trials with PfTRAP showed complete sterile protection in more than 20% of vaccinated individuals and delayed patency in 58% (10). In fact, TRAP-specific CD8+ T lymphocytes seem to be key mediators in the protection against sporozoite challenge in mouse vaccination assays (11) and in clinical trials with PfTRAP-vaccinated human individuals (10). However, antibodies are also important players in protection due to its activity on sporozoite motility/invasion blocking (12, 13) and, in this context, recent sero-epidemiological studies showed

that anti-PfTRAP antibodies were negatively correlated with parasite density among infected individuals in malaria endemic areas (14, 15).

However, there is still little knowledge about TRAP natural antigenicity in *P. vivax*-exposed populations. Epidemiological, genetic, and environmental factors can influence the development of immunity against malaria parasites, and the understanding of humoral immune responses is relevant because the knowledge of the specific patterns of antibodies response across different endemic areas worldwide can improve the vaccine development process (16). Moreover, since antibodies recognize antigens through their binding to B-cells epitopes, the prediction of epitopes recognized by the immune humoral response can allow the development of epitope-based vaccines (17–19). Our present study provides, for the first time, an evaluation of the antibody response to PvTRAP in individuals of the Brazilian Amazon, by characterizing the specific profile of PvTRAP IgG subclasses antibodies and identifying linear B-cell epitopes that participate in the natural immune acquired response. Results are discussed along with data on individual exposure and protection.

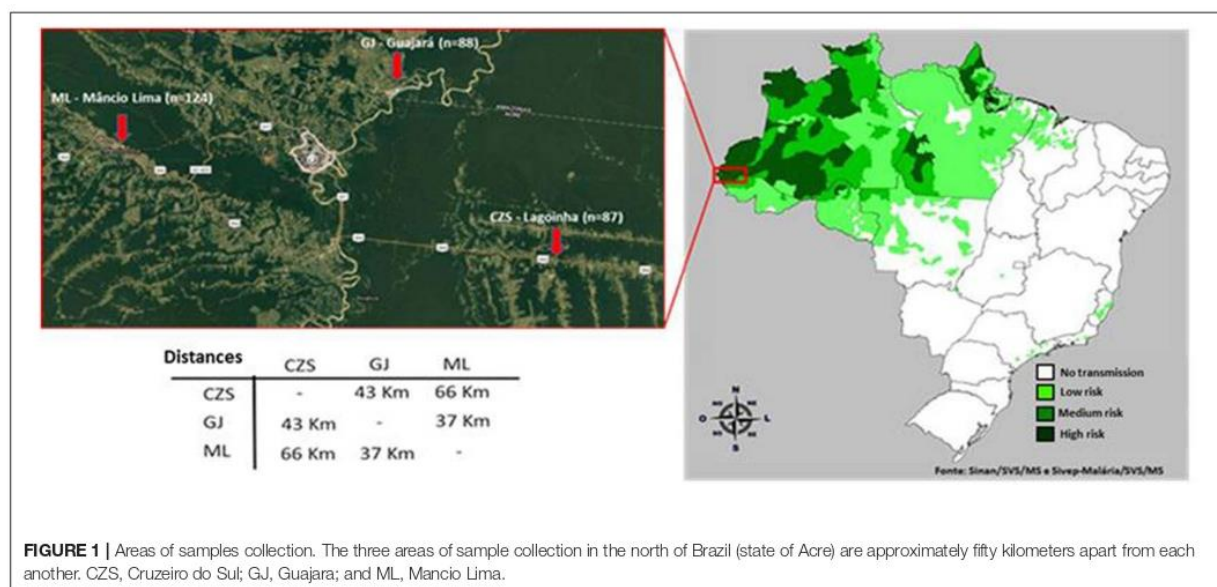
## MATERIALS AND METHODS

### Study Area and Volunteers

A cross-sectional cohort study was conducted involving 352 individuals from three different endemic areas of Acre (**Figure 1**): Cruzeiro do Sul ( $n = 124$ ), Guajará ( $n = 87$ ), and Mâncio Lima ( $n = 88$ ). Fifty-three samples from individuals living in non-endemic areas from Rio de Janeiro were considered the control group. Samples and survey data were collected from June 2016 to August 2016. Written informed consent was obtained from all donors and the study was reviewed and approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248).

### Epidemiological Survey

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



## Malaria Diagnosis and Blood Sampling

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

## Recombinant PvTRAP

For the expression and purification of PvTRAP protein, the codon-optimized gene of *P. vivax* TRAP (UniProt A5K806, residues Asp25 to Lys493) was cloned into the pHLsec vector (20), which is flanked by the chicken  $\beta$ -actin/rabbit  $\beta$ -globin hybrid promoter with a signal secretion sequence and a Lys-His6 tag. Endogenous PvTRAP secretion signal (a.a. 1-24) was replaced by a signal sequence contained in the PHLsec mammalian expression plasmid (MGILPSPGMPALLSLVSLLSVLLMGCVA). In order to improve secretion of the PvTRAP protein, the C-terminal region of PvTRAP (a.a. 494-556) was deleted. The pHLsec PvTRAP plasmid (500  $\mu\text{g}$ ) was transfected in HEK-293T cells using polyethyleneimine (PEI) in roller bottles (surface area of  $2,125\text{ cm}^2$ ) under standard cell culture conditions. Five days after transfection cells were discarded and media was filtered through  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  disposable filters. The secreted protein was purified from the supernatant by Nickuel Sepharose affinity chromatography (HisTRAP<sup>TM</sup>, GE Healthcare), using the Äkta

Start chromatography system and eluted with Imidazole 500 mM. Finally, eluted protein was dialyzed using Slide-A-Lyzer<sup>TM</sup> cassette (Fisher Scientific) against 1X PBS.

## ELISA

Antibody binding to PvTRAP was evaluated on plasma samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, MaxiSorp 96-well-plates (Nunc, Rochester, NY, USA) were coated with PBS containing  $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$  of recombinant PvTRAP. After overnight incubation at  $4^{\circ}\text{C}$ , the plates were washed with PBS-Tween and blocked for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Plasma samples diluted 1:100 in PBS-Tween containing 5% non-fat dry milk (PBS-Tween-M) were added in duplicate wells for each individual. After 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and three washings procedures, specific antibodies were detected by peroxidase-conjugated anti-human IgG (Sigma, St. Louis) and followed by the addition of o-phenylenediamine and hydrogen peroxide. Optical density was accessed at 490 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Results for total IgG were expressed as reactivity indexes (RIs), which represent the mean optical density of each tested sample divided by the mean optical density of 10 non-exposed control individuals' samples plus 3 standard deviations. Subjects were scored as responders to PvTRAP if the RI of IgG against the recombinant protein was higher than 1. Additionally, IgG subclasses were evaluated on responders by the same method, using peroxidase-conjugated goat anti-human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (clone HP-6001 for IgG1, HP-6002 for IgG2, HP-6050 for IgG3, HP-6023 for IgG4 -Sigma, St. Louis).

## B-Cell Epitope Prediction

To predict linear B-cell epitopes on entire sequences of PvTRAP (U64901.1; Salvador 1), we used a combination of three prediction algorithms: BCPreds (<http://ailab.ist.psu>).

edu/bcpred/predict.html), BepiPred1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred-1.0/>), and ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred>). BepiPred 1.0 (21) is based on hidden Markov model profiles of known antigens, and also incorporates hydrophobicity and secondary structure prediction. We used the recommended cutoff of 0.90 to determine potential B-cell linear epitopes. Furthermore, ABCpred and BCpreds are both based learning methods of the machine. In this study, we considered threshold values of 0.3, 0.51, and 75% to BepiPred, ABCpred, and BCpreds, respectively. All sequences with more than 10 amino acids and predicted for at least two of prediction algorithms were considered as a linear B-cell epitope and evaluated by antigenicity using the Vaxijen algorithm (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). VaxiJen is the first server for alignment-independent prediction of protective antigens. It was developed to allow antigen classification solely based on the physicochemical properties of proteins without recourse to sequence alignment. Bacterial, viral and tumor protein datasets were used to derive models for the prediction of whole protein antigenicity, showing prediction accuracy from 70 to 89% (22). To evaluate the antigenicity of predicted epitopes we used the threshold of 0.6. All predicted epitopes with a Vaxijen score higher than threshold value (0.6) were selected to experimental validation.

### Peptide Synthesis

After a consensual analysis of the *in silico* prediction tools, four peptide sequences appeared as relevant epitopes within PvTRAP. Therefore, the sequences were synthesized by fluorenylmethoxycarbonyl (F-moc) solid-phase chemistry (23) (GenOne Biotechnologies, Brazil). Analytical chromatography of the peptides demonstrated a purity of >95% and the mass spectrometric analysis also indicated the estimated masses for each of them: 3395.78 g/mol (peptide PvTRAP<sub>R197–H227</sub>), 2332.61 g/mol (peptide PvTRAP<sub>E237–T258</sub>), 3487.59 g/mol (peptide PvTRAP<sub>P344–G374</sub>), and 2333.55 g/mol (peptide PvTRAP<sub>E439–I460</sub>).

### Confirmation of B-Cell Epitopes (Peptide ELISA)

To confirm the overlapping epitopes detected with the prediction programs, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed. MaxiSorp 96-well-plates (Nunc, Rochester, NY, USA) were coated with PBS containing 0.5 µg/ml of each peptide, followed by overnight incubation at 37°C. The plates were washed and blocked with BSA 4% for 1 h and 30 min at 37°C in the humid incubator. After this, the individual plasma samples were diluted 1:100 in PBS-Tween containing BSA 2% in duplicate wells. After 2 h at 37°C in the humid incubator, and three washings with PBS-Tween, bound antibodies were detected with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Sigma, St. Louis) and followed by the addition of o-phenylenediamine and hydrogen peroxide. Optical density was identified at 490 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). As made for recombinant protein, the results for each peptide were expressed as reactivity indexes (RIs), which were calculated by the mean optical density of

an individual's tested sample divided by the mean optical density of 10 non-exposed control individuals' samples plus 3 standard deviations.

### Statistical Analysis

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

We used a principal component analysis (PCA) to detect the variation pattern of Anti-PvTRAP total IgG, age, time of residence in endemic area, time since last infection response, and number of previous malaria infections. Our objective was to reduce dimensionality of multivariate data to detect the variables that explained the variance structure of the data. Each axis of PCA, hereafter named Principal Component (PC) represents the amount of variation associated to this axis. Each variable studied in the PCA has a loading value indicating its contribution to each PC. In the graph, individuals are represented as points located between principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2). Variables are represented as arrows and its longitude represent its contribution to the variation of data. Additionally, closer angles between variables (arrows), represents more correlated variables, and angles closer to 90° represent independence between variables (orthogonality).

To evaluate total IgG responses to PvTRAP peptides and compare with PvTRAP recombinant protein, we constructed a two-dimensional heatmap with hierarchical clustering grouping individuals with similar responses and the responses for peptides and recombinant PvTRAP. We calculated Z-scores from transformed total IgG values for PvTRAP peptides and recombinant protein:  $Z\text{-score} = [(PvTRAP\ peptides/recombinant\ protein\ total\ IgG\ values - population\ PvTRAP\ peptides/recombinant\ protein\ total\ IgG\ mean\ value)/population\ PvTRAP\ peptides/recombinant\ protein\ total\ IgG\ standard\ deviation]$ . Clustering was performed from Z-scores using Euclidean distance metrics and Ward as the linkage algorithm. PCA was constructed using vegan package (24) and a two-dimensional heatmap was build using gplots package (25) in R statistical environment (26).

## RESULTS

### Epidemiological Profile of Studied Individuals

The studied population is composed of 299 individuals living in three close municipalities of the Brazilian Amazon. The majority was composed by adults and all individuals were naturally exposed to malaria infection (Table 1). The age range was 12–88 years with an average of 35 years, and the cohort presented a similar prevalence in gender (male = 48.3%; female = 51.7%).



**TABLE 1 |** Summary of the epidemiological characteristics of studied individuals enrolled in the survey.

Epidemiological features	Total
	<b>(N = 299)</b>
<b>Gender</b>	<b>N (%)</b>
Male	48.3%
Female	51.7%
<b>Malaria exposure</b>	<b>Mean (<math>\pm</math>SD)</b>
Age	35 ( $\pm$ 15.97)
Time of residence in the endemic area	34 ( $\pm$ 16.10)
Time of residence in the present address	24 ( $\pm$ 19.35)
Months since the last malaria episode	33 ( $\pm$ 57.07)
Number of malaria episodes on the last year	0.82 ( $\pm$ 1.13)
Number of previous malaria episodes	10 ( $\pm$ 12.41)
<b>Previous species contracted</b>	<b>N (%)</b>
<i>P. vivax</i>	56 (19%)
<i>P. falciparum</i>	16 (5%)
<i>P. vivax</i> and <i>P. falciparum</i>	186 (62%)
Never infected	7 (2%)
Not reported	34 (11%)
<b>Diagnosis</b>	<b>N (%)</b>
<i>P. vivax</i>	73 (24.4%)
<i>P. falciparum</i>	41 (13.7%)
Mixed	4 (1.3%)
Negative	181 (60.5%)
<b>Species of the last infection</b>	<b>N (%)</b>
<i>P. vivax</i>	173 (48%)
<i>P. falciparum</i>	62 (17%)

Values of age, time of residence in endemic areas (TREA) and time of residence in the present address (TRPA), months since the last malaria episode (MSLM), number of malaria episodes on the last year, and number of previous malaria episodes (NPME) are represented by mean (with standard variation values). The frequency of individuals regarding to malaria diagnosis, previous infections and species of the last infection was compared by Fisher's test, and other epidemiological parameters were compared by Mann-Whitney test. We can observe that the prevalence of *P. vivax* cases is significantly higher than that of *P. falciparum* cases ( $p < 0.0001$ ).

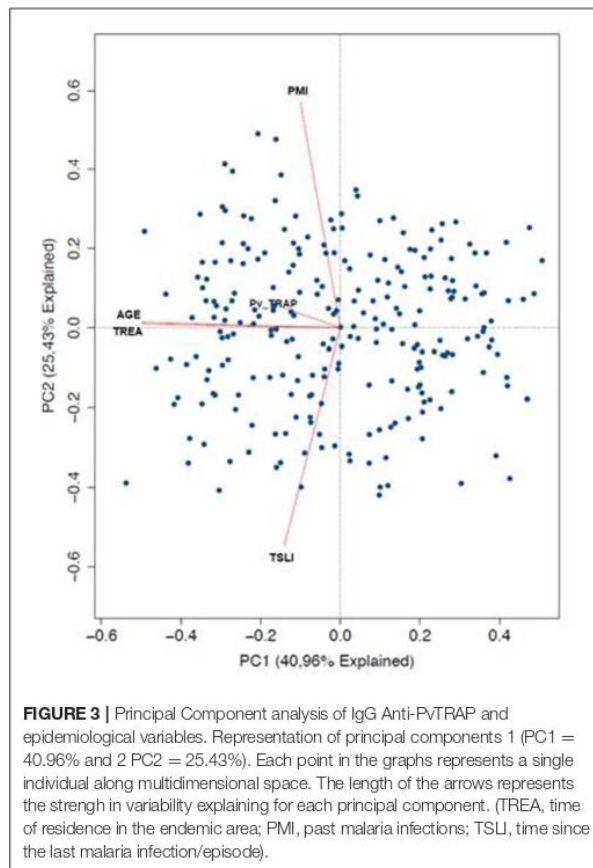
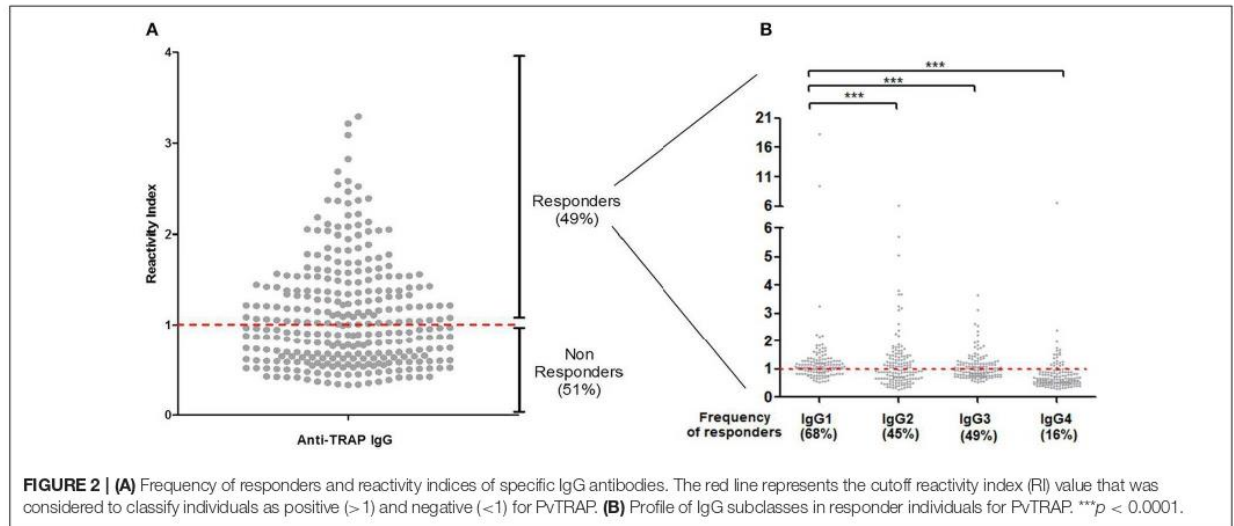
The time of residence in malaria endemic area (TREA) ranged from 3 to 88 years, which indicated different degrees of exposure among the studied individuals. With regards to prior history of malaria infections, 11% of all studied individuals did not remember having had previous malaria episodes (PME) and 2% did not report any malaria episode during their entire life. Sixty-two percent informed us of previous episodes of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria during their entire life, which are the two prevalent species in Brazil. The number of past infections reported by individuals also varied greatly, ranging from 0 to 48 (mean =  $8.62 \pm 10.24$ ) and the time elapsed since the last infection (TLI) varied from 0 to 240 months (mean =  $33.5 \pm 57.1$ ). Finally, at the time of blood collection, 118 (39.5%) individuals were naturally infected with *Plasmodium* sp. The frequency of *P. vivax* infections (24.4%) was significantly higher than that of *P. falciparum* infections (13.7%;  $p = 0.0016$ ). Collectively, the parameters evaluated indicated that the studied population are naturally exposed to malaria, but have different degrees of exposure and/or immunity.

## Frequency and Magnitude of IgG Immune Response Against Recombinant PvTRAP

To verify if PvTRAP is a target of naturally acquired humoral response against *P. vivax* in Brazilian amazon individuals, we assessed the IgG reactivity against the recombinant antigen. Firstly, we confirmed that PvTRAP is immunogenic in naturally exposed individuals from the Brazilian Amazon, as 148 (49%) individuals presented specific antibodies against the recombinant PvTRAP (Figure 2A) with no significant difference among *P. vivax* or *P. falciparum* infected individuals and exposed but non-infected individuals (Figure S1). Among responders, the reactivity indexes (RI) values ranged from 1.01 to 4.29 (mean =  $1.55 \pm 0.48$ ). We also assessed the overall distribution of the IgG antibody subclass responses to PvTRAP protein using different comparative analyses. Secondly, we determined subclass-specific prevalence in total IgG positive responders, in which IgG1 was the most prevalent subclass present in 68% of responders (Figure 2B), followed by IgG3 (49%) and IgG2 (45%). The subclass with the lower frequency was IgG4 (16%). The frequency of IgG1 responders was significantly higher when compared to IgG2 ( $p = 0.0002$ ), IgG3 ( $p = 0.0021$ ), and IgG4 ( $p < 0.0001$ ). Thirdly, in relation to magnitude of antigen-specific IgG subclass responses, a wide distribution of RIs was observed, which ranged from 0.28 observed in IgG2 to 18.33 in IgG1. However, the overall mean of specific subclass RIs indicate that IgG1 cytophilic antibodies against PvTRAP (mean =  $1.53 \pm 1.91$ ) was also significantly higher ( $p < 0.0001$ ) than all other subclasses (IgG2 =  $1.17 \pm 0.93$ , IgG3 =  $1.08 \pm 0.47$ ), and IgG4 (mean =  $0.76 \pm 0.60$ ).

## Influence of Malaria Exposure on Naturally Acquired IgG Against PvTRAP

In order to identify the contribution of epidemiological data on the variation observed in humoral response to PvTRAP, data was matched with the magnitude and frequency of responses to PvTRAP. Firstly, we noted that the distribution of individuals into ordination space was homogeneous, without evident groups into it. Age and TREA were highly correlated, and previous malaria infections as well as time since last malaria infection were negatively correlated between them. However, only age and TREA was related to RIs against PvTRAP IgG to data variation. The nature of variables relationship was confirmed by calculating the correlation between the anti-PvTRAP IgG reactivity index and age ( $r = 0.190$ ;  $p = 0.001$ ) and TREA ( $r = 0.194$ ;  $p = 0.001$ ). Antibody levels and the number of previous infections were orthogonal variables and we also did not observe correlation ( $r = 0.013$ ;  $p = 0.832$ ). A similar result was observed in the PCA for anti-PvTRAP IgG reactivity index and time elapsed since the last malaria episode ( $r = -0.051$ ;  $p = 0.398$ ) (Figure 3). Regarding the IgG subclass and malaria exposure and/or indicatives of protection, there was no significant difference between subclass responders and non-responders in relation to TREA or PME. However, interestingly, the time elapsed since the last malaria episode was significantly higher in TRAP-specific IG3 responders than non-responders (Figure 4). This finding was corroborated by the observed



correlation between IgG3 RIs against PvTRAP and the time elapsed since the last malaria episode ( $r = 0.184$ ;  $p = 0.0032$ ).

### *In silico* Prediction of B-Cell Linear Epitopes of PvTRAP

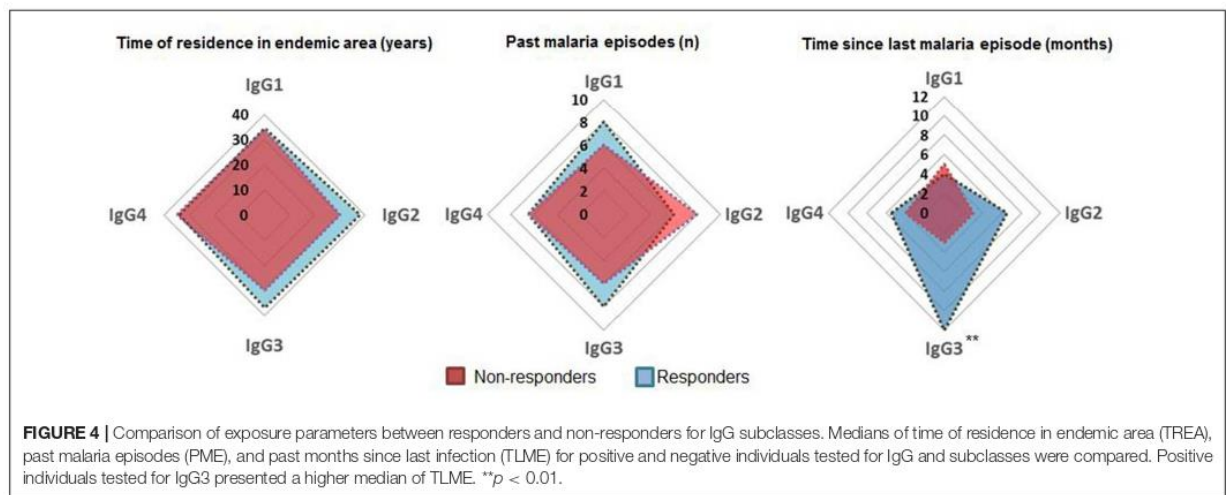
Firstly, five sequences were predicted as potential linear B-cell epitopes on PvTRAP (PvTRAP<sub>R197–H227</sub>, PvTRAP<sub>E237–T258</sub>, PvTRAP<sub>P260–K279</sub>, PvTRAP<sub>P344–G374</sub>, and PvTRAP<sub>E439–K454</sub>) (Figure 5A). Among these sequences, four (PvTRAP<sub>R197–H227</sub>, PvTRAP<sub>E237–T258</sub>, PvTRAP<sub>P344–G374</sub>, and PvTRAP<sub>E439–K454</sub>) presented Vaxijen score higher than threshold value (0.6) and were considered antigenic epitopes selected to experimental validation. Regarding the localization of predicted antigenic linear B-cell epitopes, epitopes PvTRAP<sub>E237–T258</sub>; PvTRAP<sub>P344–G374</sub>, and PvTRAP<sub>E439–K454</sub> were localized in repeat region of TRAP, while epitope PvTRAP<sub>R197–H227</sub> was inserted in thrombospondin type I repeat (TSR) domain (Figure 5B).

### Experimental Validation of Predicted Linear B-Cell Epitopes

To validate predicted antigenic epitopes of PvTRAP, we tested by ELISA the plasma from responders to the recombinant protein, against selected epitopes (PvTRAP<sub>R197–H227</sub>, PvTRAP<sub>E237–T258</sub>, PvTRAP<sub>P344–G374</sub>, and PvTRAP<sub>E439–K454</sub>).

Among the 148 responders to PvTRAP recombinant protein, as showed in Figure 6, all predicted epitopes (PvTRAP<sub>R197–H227</sub>, PvTRAP<sub>E237–T258</sub>, PvTRAP<sub>P344–G374</sub>, and PvTRAP<sub>E439–K454</sub>) presented low frequencies of responders (26, 25, 32, and 29%, respectively). Beside, peptide R<sub>197–H227</sub> presented the lowest magnitude of response (median = 1.25 interquartile range = 1.13–1.47) when compared to PvTRAP<sub>E237–T258</sub>, PvTRAP<sub>P344–G374</sub>, or PvTRAP<sub>E439–K454</sub> (median = 1.60 interquartile range = 1.22–2.65,  $p = 0.003$ ; median = 1.87 interquartile range = 1.12–2.61,  $p < 0.0001$ ; median = 1.44 interquartile range = 1.16–2.08,  $p = 0.035$ ; respectively).

In order to investigate the protective role of antibodies against linear epitopes of PvTRAP, we compared epidemiological data from individuals who recognized at least one of the linear



epitopes with data from those who did not recognize linear epitopes. Interestingly, individuals who were responders to linear epitopes presented a lower mean of the time elapsed since the last malaria episode (mean =  $23.97 \pm 49.78$ ) and a higher number of previous malaria episodes (mean =  $13.35 \pm 14.10$ ) when compared to non-responders (mean =  $40.20 \pm 63.91$ ,  $p = 0.0175$ ; mean =  $8.35 \pm 9.60$ ,  $p = 0.005$ , respectively).

In order to understand the profile of IgG directed to peptides and its relationship to IgG response detected against recombinant PvTRAP, we used a clustered bidimensional heatmap (Figure 7). In the vertical cluster localized in the left side of the heatmap, we noted that those peptides grouped in the first level of the cluster. PvTRAP<sub>E237-T258</sub> and PvTRAP<sub>E439-k460</sub> presented more similarity followed by PvTRAP<sub>R197-H227</sub> and PvTRAP<sub>P344-G374</sub>. The IgG responses were heterogeneous. IgG values for peptides were more similar between them compared to recombinant PvTRAP. Nevertheless, responses for recombinant PvTRAP were heterogeneous and not matched with high RI values for peptides. We also observed a mixed profile of responses including individuals that responded to recombinant PvTRAP but not to peptides, other non-responders to peptides and recombinant PvTRAP, and individuals that responded to peptides and recombinant PvTRAP.

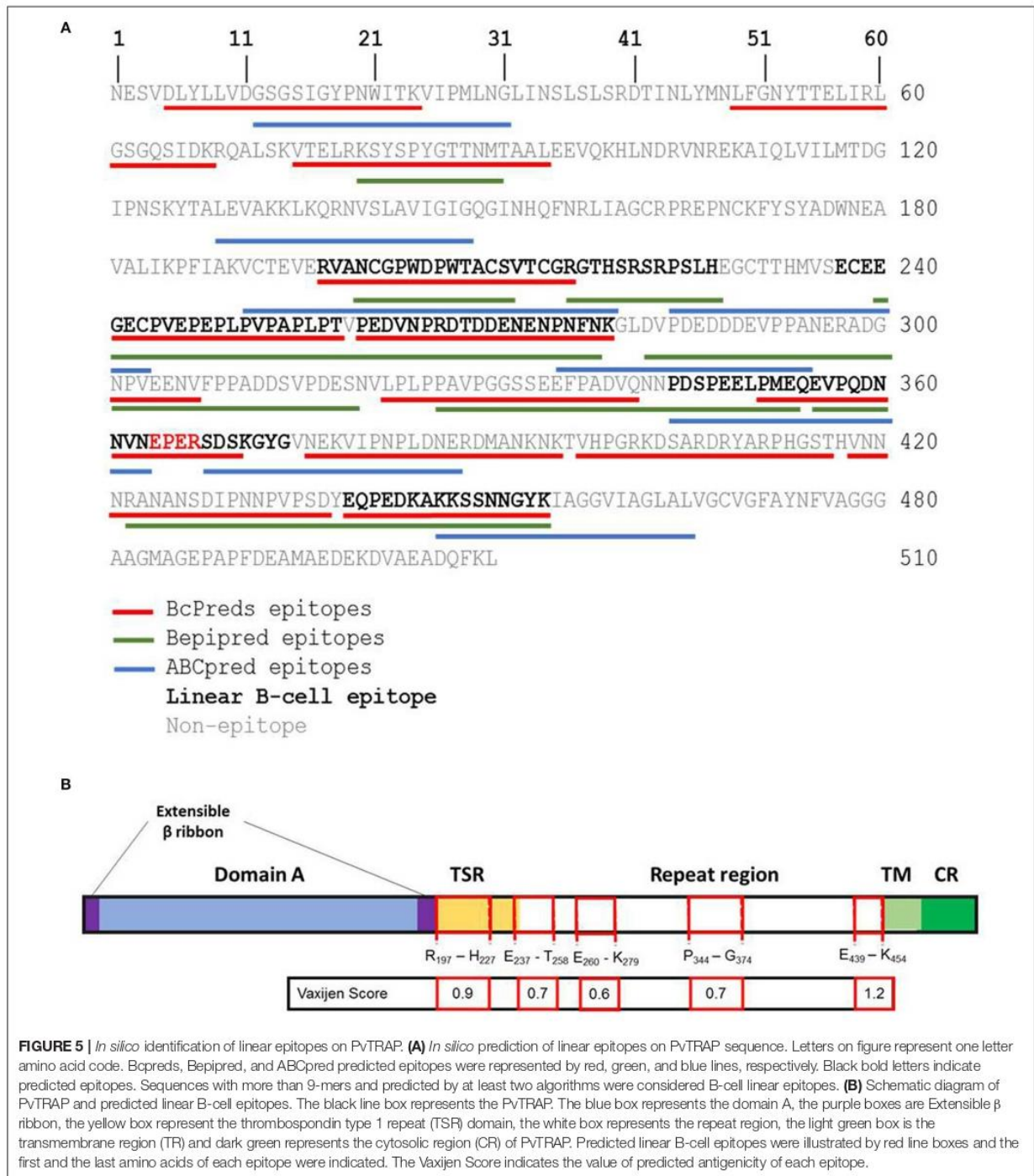
## DISCUSSION

Despite numerous advances in the understanding of the biology of *Plasmodium vivax*, there is still no vaccine against this parasite. Recently, PvTRAP has emerged as a leading vaccine candidate (27). Sero-epidemiological studies have played a significant role in the identification of leading vaccine candidates (28), which underlies the importance of assessing the immune response against PvTRAP and its role in immunity in exposed individuals from endemic regions, such as within the Brazilian Amazon. Here, we have assessed the naturally acquired humoral immune response against a recombinant PvTRAP and have investigated the associations between TRAP-specific immune responses with

the epidemiological profile of inhabitants of three municipalities in the southwestern Brazilian Amazon. We additionally searched for linear B-cell epitopes in the entire PvTRAP sequence and associated the immune response against epitopes and the recombinant protein.

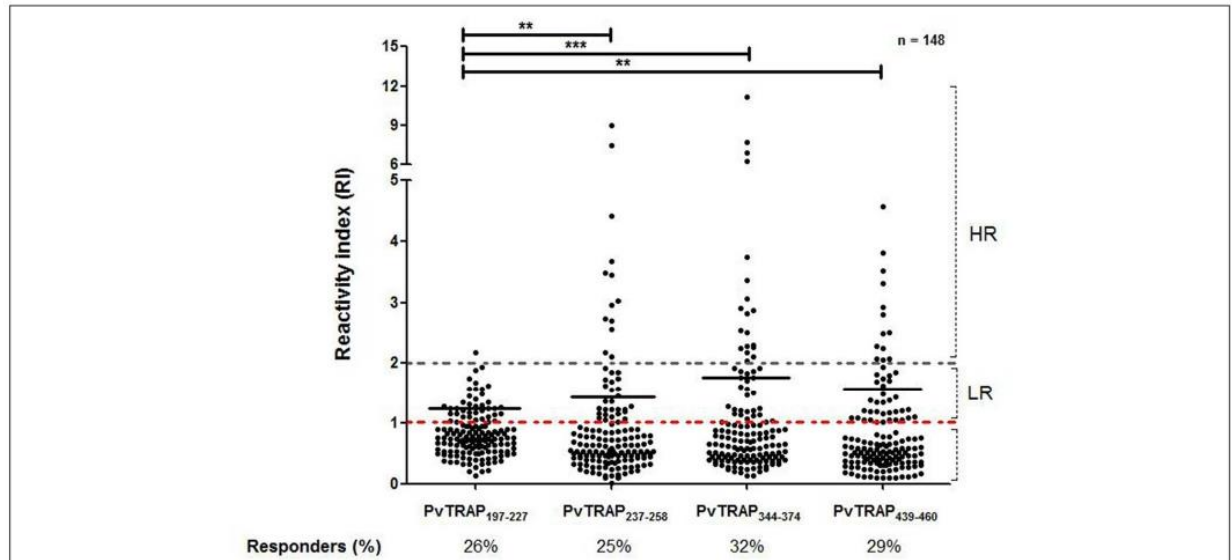
The profile of studied individuals indicates that our population is composed of rainforest region natives and migrants from non-endemic areas of Brazil who had lived in the area for more than 10 years (92%). The majority of individuals reported a prior exposure to *P. vivax* and *P. falciparum* malaria parasites. The highly variable range of numbers of previous infections, the time of residence in endemic area, and the time elapsed since the last infection, suggest that there are differences in exposure and immunity. It is well-known that the acquisition of clinical immunity is mediated by antibodies and depends on continued exposure to the parasite (29, 30). Selection of individuals in this cohort from the Amazon was ideal to assess presence of antibodies against the PvTRAP and distinguish whether their relationship to malaria exposure and/or indicatives of protection.

Firstly, we confirmed that PvTRAP is naturally immunogenic in individuals from the Amazon, since almost half of volunteers studied presented TRAP-specific IgG antibodies with a wide range in magnitude of IgG response. Our results were similar to TRAP reactivity in South East Asia, where Kosuwini et al. found an overall 51% reactivity against PvTRAP Domain II in Thailand in exposed individuals (31), and in middle-east endemic areas, where Nazeri et al. found an immune response with related frequencies in Iran (42%), Afghanistan (38%), and Pakistan (44%) (16). The frequency of responders to PvTRAP in Brazilian endemic areas herein reported was also comparable to other *P. vivax* vaccine candidates, such as AMA-1 (32), MSP-9 (33), MSP-1 (34), and DBP (35) in Amazon regions, as well as to PfTRAP in unstable transmission endemic areas of Africa (36) and Iran (37). Despite the naturally acquired immune response against PvTRAP being confirmed in studied areas, we did not find differences in reactivity index of IgG

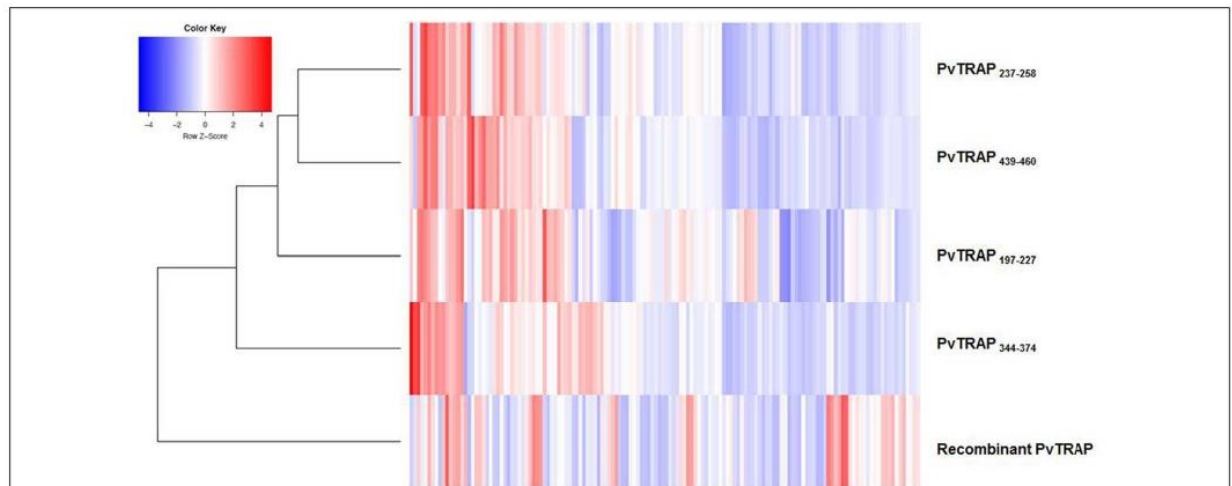


antibodies among exposed individuals with *P. falciparum*, *P. vivax* and negatives. As expected, such differences are most noticeable in serology against erythrocyte phase antigens, since individuals residing in the transmission areas may be constantly

receiving infectious stimuli by sporozoites that could not develop the disease but still stimulate the immune system and the production of specific antibodies. It is important to mention that recently a frequency of uninfected responders against PfCSP and



**FIGURE 6 |** Frequency of responders for tested peptides and mean of RI among responders (low responders and high responders). Each point represents an individual RI against PvTRAP and the red traced line represents the cutoff that separates responders and non-responders. The gray dotted line separates the individuals tested in low responders (LR) (RI > 1 and RI < 2) and high responders (HR) (RI > 2). Peptide PvTRAP<sub>R197–H227</sub> presented a lower median of RI than peptide PvTRAP<sub>E237–T258</sub> ( $p = 0.0049$ ), peptide PvTRAP<sub>P344–G374</sub> ( $p < 0.0001$ ), or peptide PvTRAP<sub>E439–K454</sub> ( $p = 0.0073$ ).



**FIGURE 7 |** Clustered heatmap. Each cell represents the IgG value for the studied PvTRAP peptides and recombinant protein. The vertical cluster shows the grouping hierarchy of PvTRAP peptides and recombinant protein. Along horizontal axis, individuals with similar responses are grouped. The red color in the cells indicates high IgG values and the blue color indicates low ones. The white color represents no changes in the IgG values for PvTRAP peptides and recombinant protein.

PvCSP derived antigens was also reported in Brazilian endemic areas (38).

Studies on the humoral immune responses to *P. falciparum* antigens have constantly shown that immunity to blood-stage antigens is dependent on a specific pattern of immunoglobulin subclass response. Pattern of IgG subclasses responses of IgG1 and/or IgG3 antibodies to several blood-stage antigens are

effective mediators of antibody-dependent cellular inhibition (ADCI) of malaria parasites growth *in vitro*, associated with the acquisition of clinical immunity to malaria (39–42) and with fixation and complement activation (43). In fact, the subclass-specific antibodies to *P. vivax* in the development of protective immunity is still unclear and the effect of each IgG subclass is still controversial. In our cohort, the IgG

subclass profile among responders revealed an IgG1 biased humoral response with a considerable frequency of IgG3 and IgG2 antibodies. The prevalence of cytophilic antibodies against TRAP was also observed in individuals from the Middle East. However, the high frequency of IgG2 found in our work was not observed in individuals from those studies (16). In fact, we can hypothesize that host genetics factors, such HLA polymorphisms, can affect the development of specific immune response against PvTRAP as it does against other *P. vivax* antigens (44). In addition, epidemiological and environmental factors certainly affect the immune repertoire activation, potential of recognition and magnitude of TRAP-specific antibodies in such different regions. Therefore, the parameters of exposure and/or protection available in our epidemiological survey were matched with the magnitude of IgG specific antibodies in order to allow the study of potential associations. Regarding exposure, age, and time of residence in endemic areas were correlated with magnitude of anti-PvTRAP IgG antibodies. However, since in our study the majority of individuals were born in endemic areas, age related changes in antibody responses could reflect, in fact, only the time of exposure in an endemic region. This phenomenon has been frequently reported for various antigens (45–48) and most likely could reflect exposure to the malaria parasite and possibly maturation of the immune system over time, which can culminate in protection against subsequent infections. Unfortunately, the cross-sectional design of our study limited the investigation to retrospective malaria histories reported by the volunteers, and the best approximation of an individual's protection was the time elapsed since their last recalled malaria episode. Using this approach, we observed that IgG3 responders presented a significantly longer time since the last malaria episode than IgG3 non-responders. These results could suggest a possible role of PvTRAP cytophilic antibodies in protective immunity against *P. vivax* infection. However, more prospective studies on humoral immune responses with a follow up of participants and/or biologic studies addressing the ability of these antibodies to inhibit sporozoite motility or invasion will provide more direct evidence in protective efficacy of specific PvTRAP antibodies.

Whilst there is strong evidence showing that specific antibodies are associated with cumulative exposure and protection against vivax malaria (28, 30, 49–51), the relative contribution of different regions to the molecule inducing protective antibodies is another important point to be addressed. Therefore, we also map the linear epitopes in PvTRAP using *in silico* tools and confirmed the antigenicity by ELISA in PvTRAP responders. The four linear epitopes in PvTRAP sequence were identified in different regions of protein (PvTRAP<sub>R197–H227</sub> in the TSR domain; PvTRAP<sub>E237–T258</sub> in a region between the repeat region and TSR domain; PvTRAP<sub>P344–G374</sub> fully in the repeat region; and PvTRAP<sub>E439–I460</sub> in the repeat region near to the transmembrane domain). It is important to mention that two extracellular portions of PvTRAP (Domain II and repetitive region) are crucial for initial host cell adherence and stabilization of adhesion/deadhesion during gliding mobility of sporozoites (52) and are associated with protective immunity against *P. falciparum* (50). In our work, no linear epitope was confirmed in

Domain II and the epitopes located at repetitive region presented low frequency of reactivity among responders to full-length recombinant PvTRAP. The frequencies and magnitude of antibodies against PvTRAP-derived peptides were also lower than other linear epitopes identified in sporozoite surface of *P. vivax*, such CelTOS (53) and CSP (54, 55), and merozoites (MSP9 and AMA-1) (19, 56). Indeed, despite the observation of a discrete immunodominance of PvTRAP<sub>P344–G374</sub> fragment over the other peptide epitopes, the heatmap analysis and the correlation of reactivity index against recombinant protein did not show a possible relationship with epidemiological parameters related to exposure or protection. The Domain II folded region probably presents conformational epitopes, which seem to be more related with blocking activity and protective immunity, making it a more suitable candidate for vaccine development. Therefore, the functional roles of these specific antibodies need to be further investigated. Lastly, although we have found a high response against PvTRAP, we do not believe that there is a cross response between PfTRAP and PvTRAP as the amino acid sequence of these proteins has low homology and prediction of epitopes for both proteins revealed no potentially antigenic sequence shared (data not shown). In addition, the B cell epitopes confirmed in our study are not preserved following PfTRAP.

In conclusion, this study describes the naturally acquired antibody response against PvTRAP in three endemic municipalities of the Brazilian Amazon. The IgG immune response was associated with exposure and mainly mediated by cytophilic IgG1 antibodies. A significant proportion of IgG3 responders presented a higher time elapsed since the last malaria episode, which could indicate the participation of anti-PvTRAP specific antibodies in protective immune response. Lastly, beyond the validation of four linear B-cell epitopes within PvTRAP full-length sequence, the low response observed against the peptide epitopes could suggest that the functional Domain II of PvTRAP present conformational epitopes. Therefore, more studies need to be addressed to this unexplored target.

## DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript/**Supplementary Files**.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM, JL-J, LP-R, and AR-S: conceptualization. AM, JL-J, RR, and JS-A: formal analysis. AM, IS, and RR: investigation.

AM, RR, IS, LB-C, and BB: methodology. BB, LP-R, PT, AR-S, CL-C, and RS: sampling and resources. AM, JL-J, and RR: writing—original draft. LP-R, CD-R, CL-C, AR-S, and PT: writing—review and editing.

## FUNDING

This work was also funded by Brazilian National Research Council—CNPq/PAPES (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Programa de Apoio Pesquisa Estratégica em Saúde), Inovabio grant program (BIO-004-FIO-17-2-11—Bio-Manguinhos/Fiocruz), and FIOCRUZ (PAEF II, IOC-023-FIO-18-2-47).

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all individuals who participated in this study for their cooperation and generous donation of

blood, which made this study possible. CD-R and JL-J received a Research Productivity Fellowship from the Brazilian National Research Council (CNPq), and CD-R and JL-J were recipients of a grant from Faperj as *Cientista do Nosso Estado* and *Jovem Cientista do Nosso Estado*, respectively.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02230/full#supplementary-material>

**Figure S1** | Reactivity index (RI) of non-exposed individuals (controls), *P. vivax*, *P. falciparum*, and non-infected exposed individuals. The reactivity index presented no statistical significance among the malaria exposed groups independently of infection status. The reactivity index of non-exposed individuals was significantly lower than exposed individuals (\*\* $p < 0.0001$ ), *P. falciparum* (\*\* $p < 0.0001$ ), and *P. vivax* (\*\* $p < 0.0001$ ).

## REFERENCES

- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. (2010) 4:e774. doi: 10.1371/journal.pntd.0000774
- World Health Organization. *World Malaria Report 2018* (2018).
- Muller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J*. (1993) 12:2881–9. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05950.x
- Sinnis P, Sim BK. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. *Trends Microbiol*. (1997) 5:52–8. doi: 10.1016/S0966-842X(97)84657-4
- Song G, Koksak AC, Lu C, Springer TA. Shape change in the receptor for gliding motility in *Plasmodium* sporozoites. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109:21420–5. doi: 10.1073/pnas.1218581109
- Kappe SHI, Buscaglia CA, Bergman LW, Coppens I, Nussenzweig V. Apicomplexan gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model. *Trends Parasitol*. (2004) 20:13–6. doi: 10.1016/j.pt.2003.10.011
- Chenet SM, Tapia LL, Escalante AA, Durand S, Lucas C, Bacon DJ. Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. (2012) 11:68. doi: 10.1186/1475-2875-11-68
- Atcheson E, Bauza K, Salman AM, Alves E, Blight J, Viveros-Sandoval ME, et al. Tailoring a *Plasmodium vivax* vaccine to enhance efficacy through a combination of a CSP virus-like particle and TRAP viral vectors. *Infect Immun*. (2018) 86:e0114-18. doi: 10.1128/IAI.00114-18
- Castellanos A, Arevalo-Herrera M, Restrepo N, Gulloso L, Corradin G, Herrera S. *Plasmodium vivax* thrombospondin related adhesion protein: immunogenicity and protective efficacy in rodents and Aotus monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2007) 102:411–6. doi: 10.1590/S0074-02762007005000047
- Ewer KJ, O'Hara GA, Duncan CJ, Collins KA, Sheehy SH, Reyes-Sandoval A, et al. Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nat Commun*. (2013) 4:2836. doi: 10.1038/ncomms3836
- Arevalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. *Mol Immunol*. (2001) 38:443–55. doi: 10.1016/S0161-5890(01)00080-3
- Mishra S, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Antibodies to *Plasmodium circumsporozoite* protein (CSP) inhibit sporozoite's cell traversal activity. *J Immunol Methods*. (2012) 377:47–52. doi: 10.1016/j.jim.2012.01.009
- Hollingdale MR, Zavala F, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Antibodies to the protective antigen of *Plasmodium berghei* sporozoites prevent entry into cultured cells. *J Immunol*. (1982) 128:1929–30.
- Ogwang C, Kimani D, Edwards NJ, 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) 7:286re5. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2373
- Mensah VA, Gueye A, Ndiaye M, Edwards NJ, Wright D, Anagnostou NA, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of prime-boost vaccination with ChAd63 and MVA encoding ME-TRAP against *Plasmodium falciparum* infection in adults in senegal. *PLoS ONE*. (2016) 11:e0167951. doi: 10.1371/journal.pone.0167951
- Nazeri S, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND. Naturally acquired immune responses to thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) of *Plasmodium vivax* in patients from areas of unstable malaria transmission. *Acta Trop*. (2017) 173:45–54. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.05.026
- Van Regenmortel MH. Immunoinformatics may lead to a reappraisal of the nature of B cell epitopes and of the feasibility of synthetic peptide vaccines. *J Mol Recognit*. (2006) 19:183–7. doi: 10.1002/jmr.768
- Dudek NL, Perlmutter P, Aguilar MI, Croft NP, Purcell AW. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr Pharm Des*. (2010) 16:3149–57. doi: 10.2174/138161210793292447
- Rodrigues-da-Silva RN, Martins da Silva JH, Singh B, Jiang J, Meyer EV, Santos F, et al. *In silico* identification and validation of a linear and naturally immunogenic B-cell epitope of the *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidate merozoite surface protein-9. *PLoS ONE*. (2016) 11:e0146951. doi: 10.1371/journal.pone.0146951
- Aricescu AR, Lu W, Jones EY. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallograph Sec D*. (2006) 62:1243–50. doi: 10.1107/S0907444906029799
- Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. (2006) 2:2. doi: 10.1186/1745-7580-2-2
- Doytchinova IA, Flower DR. Vaxijen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. (2007) 8:4. doi: 10.1186/1471-2105-8-4
- Gausepohl H, Boulin C, Kraft M, Frank R. Automated multiple peptide synthesis. *Pept Res*. (1992) 5:315–20.
- Oksanen J, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, O'Hara R, Simpson G, et al. *Vegan: Community Ecology Package*. Oulu: R Package Version 1.17–11. 2011 (2010).
- Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Liaw WHA, Lumley T, et al. *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. R Package Version 2.17. 0. Pittsford, NY: Computer software (2015).
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing (2018).

27. Dolo A, Modiano D, Doumbo O, Bosman A, Sidibe T, Keita MM, et al. Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. *Parassitologia*. (1999) 41:425–8.
28. França CT, White MT, He WQ, Hostetler JB, Brewster J, Frato G, et al. Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. *eLife*. (2017) 6:e28673. doi: 10.7554/eLife.28673
29. Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJF, Moraes CG, Martins MS, et al. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg*. (2002) 66:461–6. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.461
30. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*. (2009) 22:13–36. doi: 10.1128/CMR.00025-08
31. Kosuwir R, Feng M, Makiuchi T, Putaporntip C, Tachibana H, Jongwutiwes S. Naturally acquired IgG antibodies to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP) in Thailand predominantly elicit immunological cross-reactivity. *Trop Med Int Health*. (2018) 23:923–33. doi: 10.1111/tmi.13083
32. Sanchez-Arcila JC, de Franca MM, Pereira VA, Vasconcelos MP, Teva A, Perce-da-Silva Dde S, et al. The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax*-specific antibody responses to MSP-119 and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon. *Malar J*. (2015) 14:442. doi: 10.1186/s12936-015-0978-7
33. Lima-Junior J, Tran T, Meyer E, Singh B, De-Simone SG, Santos F, et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. *Vaccine*. (2008) 26:6645–54. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.029
34. Riccio EKP, Totino PRR, Pratt-Riccio LR, Ennes-Vidal V, Soares IS, Rodrigues MM, et al. Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-119 malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. *Malar J*. (2013) 12:326. doi: 10.1186/1475-2875-12-326
35. Kano FS, Sanchez BAM, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. (2012) 17:989–1000. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x
36. Noland GS, Hendel-Paterson B, Min XM, Moormann AM, Vulule JM, Narum DL, et al. Low prevalence of antibodies to preerythrocytic but not blood-stage *Plasmodium falciparum* antigens in an area of unstable malaria transmission compared to prevalence in an area of stable malaria transmission. *Infect Immun*. (2008) 76:5721–8. doi: 10.1128/IAI.00591-08
37. Pirahmadi S, Zakeri S, Mehrizi AA, Karimi L, Djajid ND. Heterogeneity in the acquisition of naturally acquired antibodies to cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CeTOS) and thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* in naturally infected patients from unstable malaria areas in Iran. *Acta Trop*. (2019) 190:365–74. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.12.014
38. Pereira VA, Sánchez-Arcila JC, Vasconcelos MPA, Ferreira AR, de Souza Videira L, Teva A, et al. Evaluating seroprevalence to circumsporozoite protein to estimate exposure to three species of *Plasmodium* in the Brazilian Amazon. *Infect Dis Poverty*. (2018) 7:46. doi: 10.1186/s40249-018-0428-1
39. Metzger WG, Okenu DM, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol*. (2003) 25:307–12. doi: 10.1046/j.1365-3024.2003.00636.x
40. 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) 182:409–18. doi: 10.1084/jem.182.2.409
41. Cavanagh DR, Dobano C, Elhassan IM, Marsh K, Elhassan A, Hviid L, et al. Differential patterns of human immunoglobulin G subclass responses to distinct regions of a single protein, the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. (2001) 69:1207–11. doi: 10.1128/IAI.69.2.1207-1211.2001
42. Topolska AE, Richie TL, Nhan DH, Coppel RL. Associations between responses to the rhoptry-associated membrane antigen of *Plasmodium falciparum* and immunity to malaria infection. *Infect Immun*. (2004) 72:3325–30. doi: 10.1128/IAI.72.6.3325-3330.2004
43. Kurtovic L, Behet MC, Feng G, Reiling L, Chelimo K, Dent AE, et al. Human antibodies activate complement against *Plasmodium falciparum* sporozoites, and are associated with protection against malaria in children. *BMC Med*. (2018) 16:61. doi: 10.1186/s12916-018-1054-2
44. Lima-Junior JdC, Pratt-Riccio LR. Major histocompatibility complex and malaria: focus on *Plasmodium vivax* infection. *Front Immunol*. (2016) 7:13. doi: 10.3389/fimmu.2016.00013
45. Pratt-Riccio LR, Lima-Junior JC, Carvalho LJ, Theisen M, Espindola-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) 73:1096–103. doi: 10.4269/ajtmh.2005.73.1096
46. Tran TM, Oliveira-Ferreira J, Moreno A, Santos F, Yazdani SS, Chitnis CE, et al. Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. *Am J Trop Med Hyg*. (2005) 73:244–55. doi: 10.4269/ajtmh.2005.73.244
47. Baird JK. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol*. (1998) 92:367–90. doi: 10.1080/00034989859366
48. Ceravolo IP, Bruna-Romero O, Braga EM, Fontes CJ, Brito CF, Souza JM, et al. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. (2005) 72:675–81. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.675
49. Noland GS, Jansen P, Vulule JM, Park GS, Ondigo BN, Kazura JW, et al. Effect of transmission intensity and age on subclass antibody responses to *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic and blood-stage antigens. *Acta Trop*. (2015) 142:47–56. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.10.011
50. Scarselli E, Tolle R, Koita O, Diallo M, Müller HM, Früh K, et al. Analysis of the human antibody response to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. (1993) 61:3490–5.
51. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*. (2008) 9:725–32. doi: 10.1038/ni.f.205
52. Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, et al. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J*. (1999) 18:5195–204. doi: 10.1093/emboj/18.19.5195
53. Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Lopez-Camacho C, Martins da Silva JH, Perce-da-Silva DS, Teva A, et al. *Plasmodium vivax* cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites: naturally acquired humoral immune response and B-Cell epitope mapping in Brazilian Amazon inhabitants. *Front Immunol*. (2017) 8:77. doi: 10.3389/fimmu.2017.00077
54. Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Valencia AZ, Cifuentes C, Hurtado S, et al. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Int J Parasitol*. (2004) 34:1535–46. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.10.009
55. Herrera S, Fernandez OL, Vera O, Cardenas W, Ramirez O, Palacios R, et al. Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. *Am J Trop Med Hyg*. (2011) 84(Suppl. 2):12–20. doi: 10.4269/ajtmh.2011.09-0516
56. Bueno LL, Lobo FP, Moraes CG, Mourao LC, de Avila RA, Soares IS, et al. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS ONE*. (2011) 6:e21289. doi: 10.1371/journal.pone.0021289

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

Copyright © 2019 Matos, Rodrigues-da-Silva, Soares, Baptista, Souza, Bitencourt-Chaves, Totino, Sánchez-Arcila, Daniel-Ribeiro, López-Camacho, Reyes-Sandoval, Pratt-Riccio and Lima-Junior. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## Anexo XI – Coautoria em artigo

**Recombinant *Plasmodium vivax* circumsporozoite surface protein allelic variants: antibody recognition by individuals from three communities in Brazilian Amazon.**

Isabela Ferreira Soares, César López-Camacho, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva, Ada da Silva Matos, **Barbara de Oliveira Baptista**, Paulo Renato Rivas Totino, Rodrigo Medeiros de Souza, Kate Harrison, Alba Marina Gimenez, Elisângela Oliveira de Freitas, Young Chan Kim, Joseli Oliveira-Ferreira, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, Arturo Reyes-Sandoval, Lilian Rose Pratt-Riccio, Josué da Costa Lima-Junior.



OPEN

# Recombinant *Plasmodium vivax* circumsporozoite surface protein allelic variants: antibody recognition by individuals from three communities in the Brazilian Amazon

Isabela Ferreira Soares<sup>1,7</sup>, César López-Camacho<sup>2,7</sup>, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva<sup>3,7</sup>, Ada da Silva Matos<sup>1</sup>, Barbara de Oliveira Baptista<sup>4</sup>, Paulo Renato Rivas Totino<sup>4</sup>, Rodrigo Medeiros de Souza<sup>5</sup>, Kate Harrison<sup>2</sup>, Alba Marina Gimenez<sup>2</sup>, Elisângela Oliveira de Freitas<sup>2</sup>, Young Chan Kim<sup>6,2</sup>, Joseli Oliveira-Ferreira<sup>1</sup>, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro<sup>4,6</sup>, Arturo Reyes-Sandoval<sup>6,2</sup>, Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>4</sup> & Josué da Costa Lima-Junior<sup>1✉</sup>

Circumsporozoite protein (CSP) variants of *P. vivax*, besides having variations in the protein repetitive portion, can differ from each other in aspects such as geographical distribution, intensity of transmission, vectorial competence and immune response. Such aspects must be considered to *P. vivax* vaccine development. Therefore, we evaluated the immunogenicity of novel recombinant proteins corresponding to each of the three *P. vivax* allelic variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) and of the C-terminal region (shared by all PvCSP variants) in naturally malaria-exposed populations of Brazilian Amazon. Our results demonstrated that PvCSP-VK210 was the major target of humoral immune response in studied population, presenting higher frequency and magnitude of IgG response. The IgG subclass profile showed a prevalence of cytophilic antibodies (IgG1 and IgG3), that seem to have an essential role in protective immune response. Differently of PvCSP allelic variants, antibodies elicited against C-terminal region of protein did not correlate with epidemiological parameters, bringing additional evidence that humoral response against this protein region is not essential to protective immunity. Taken together, these findings increase the knowledge on serological response to distinct PvCSP allelic variants and may contribute to the development of a global and effective *P. vivax* vaccine.

*Plasmodium*, a complex multi-stage organism, has specialized proteins that promote the parasite's survival in both vertebrate and invertebrate hosts and support the invasion of multiple cell types. Vaccines targeting sporozoites correspond to an attractive strategy widely explored since fewer than 100 sporozoites are inoculated in human

<sup>1</sup>Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>2</sup>Nuffield Department of Medicine, The Jenner Institute, The Henry Wellcome Building for Molecular Physiology, University of Oxford, Oxford, UK. <sup>3</sup>Laboratório de Tecnologia em Anticorpos Monoclonais, Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa em Malária, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>5</sup>Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro Multidisciplinar, Campus Floresta, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Brazil. <sup>6</sup>Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>7</sup>These authors contributed equally: Isabela Ferreira Soares, César López-Camacho and Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva. ✉email: josue@ioc.fiocruz.br

host during the blood meal of infected female Anopheles mosquito<sup>1</sup>. Moreover, it was already demonstrated that in mice<sup>2</sup>, non-human primates<sup>1,2</sup> and humans<sup>3</sup>, the immunization using irradiated sporozoites is capable to elicit protective immunity.

Despite the broad investigation of various proteins as vaccine candidates, the circumsporozoite surface protein (CSP) remains in the lead because it was described as sporozoites' major surface protein and it has a crucial role in sporozoite's motility and hepatocyte invasion<sup>4,5</sup>. It has been reported that the CSP play a vital role in invading to the mosquito's salivary glands, binding sporozoite to liver cells, and inactivating the host cell protein synthesis machinery<sup>6</sup>. It has already been demonstrated that specific antibodies against the *P. falciparum* circumsporozoite protein (PfCSP), present in the serum of vaccinated mice, rhesus macaques and humans, have the ability to block sporozoite invasion of hepatocytes<sup>7</sup>. Structurally, CSP contains approximately 400 amino acids and is organized into three domains: The N-terminal, which contain the conserved pentapeptide (region I); a highly repetitive species-specific central domain (repetitive region) and a conserved C-terminal domain (region II).

Currently, the most advanced malaria vaccine is the RTS,S, manufactured by GlaxoSmithKline (GSK). RTS,S, produced in *Saccharomyces cerevisiae*, consists in a recombinant vaccine comprising PfCSP's C-terminal and repeat regions in combination with hepatitis B virus' surface antigen (S)<sup>8</sup>. This already licensed vaccine is being implemented since 2018 in selected areas of Ghana, Kenya and Malawi<sup>9,10</sup>. On the other hand, such as almost all vaccine candidates currently tested, this vaccine targets only *P. falciparum*. The priority given to falciparum malaria results from the ability of this plasmodial species in producing elevated parasite loads and to invade red blood cells in all stages, causing extensive morbidity and mortality<sup>11</sup>. Nevertheless, some particularities of *P. vivax*, such as the increasing numbers of reports of severe vivax malaria<sup>12–15</sup> and the appearance of strains resistant to treatment<sup>16–18</sup>, highlight the importance of the development of a specific vaccine against *P. vivax*.

In contrast to PfCSP, *P. vivax* CSP (PvCSP) is polymorphic and has three allelic variants. Analyses in PvCSP genotypes demonstrated the existence of sequence repeats of this protein belonging to one of two types of nonapeptide repeat units known as VK210 (GDRA(A/D)GQPA) and VK247 (ANGA(G/D)(N/D)QPG)<sup>19,20</sup>. In addition, a third variant, identified by Qary et al.<sup>21</sup> as *P. vivax*-like, is different from both nonapeptide variants, and it is composed by a repeat sequence of 11-mer-APGANQ(E/G)GGAA-. Phylogenetic and serological study conducted by Souza-Neiras et al.<sup>22</sup>, has demonstrated that differences in these three variants are strictly present in the central repeats of the protein, but present several nucleotide variations with important serological impact. Therefore, it should be considered for PvCSP vaccine trials once they represent important intra-specific biological signatures. In Brazil, the prevalence of PvCSP allelic variants was previously studied and is known in several states such as Acre, Amazonas, Belém, Macapá, Mato Grosso, Pará, Porto Velho and Rondônia<sup>23,24</sup>.

Although less investigated than PfCSP, *P. vivax* CSP began to receive more attention in recent years and strategies were developed to overcome the variations in central domain. An example is the *Escherichia coli* expressed vaccine VMP001, which encodes a chimeric CSP and contains sequences with repetitions of alleles VK210 and VK247. This vaccine went into clinical testing and was capable of inducing recognition, agglutination and virulence loss of live sporozoites, due to the high levels of antibodies induced<sup>25</sup>. Salman et al. also reported the deployment of a highly protective *P. vivax* vaccine, composed by Salvador I sequences of CSP, including its C-terminal region and central repeats of VK210 and VK247, on the surface of a virus-like particle (VLP) based on the Hepatitis B surface antigen, overall known as Rv21. This vaccine was used in rodent model challenges with transgenic sporozoites, where it was capable to achieve 100% sterile protection<sup>26</sup>. In the present study, the naturally acquired humoral immune response to PvCSP repeat variants was evaluated in exposed populations of three regions in the Brazilian Amazon, using recombinant proteins for each one of the three alleles already described. We have also determined the antibody subclass profile induced by different PvCSP variants and verified the associations between the specific IgG and its subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 ad IgG4) with epidemiological characteristics that can suggest exposition and/or protection indicatives in exposed populations.

## Results

**Epidemiological profile of the studied population.** 299 individuals living in three different endemic areas of Brazilian Amazon composed our study population (Cruzeiro do Sul, Guajará and Mâncio Lima). The population age ranged from 12 to 88 years old (median 32 years) and presented similar frequencies of female and male individuals. Studied individuals have been naturally exposed to malaria infection, have been living in endemic areas for 31 years (ranging from 3 to 88 years), most frequently in the same address (0 to 88 years, median 20 years) and reporting, for 86% of the population, at least one previous malaria episode. *P. vivax* was the most prevalent species, together this species mono-infections and mixed infections corresponded to 65.2% of cases diagnosed during the period of study ( $p < 0.0001$ ), and to the leading cause of previous malaria episodes in 81% of studied individuals. The control group composed by 53 individuals from the non-endemic area of Rio de Janeiro, who never reported malaria episodes, was composed by 69.8% female and 30.2% male, ranging from 17 to 43 years old (median 20 years). The analysis of individual populations based on localities studied (Table 1) reveals a similar profile in relation to time of exposure, number of past malaria infections and diagnosis at the time of blood collection. However, volunteers residing in Guajará (GJ) presented longer time since the last malaria episode (median 12 months) than those of Cruzeiro do Sul (median 2.5 months) and Mâncio Lima (median 3.5 months;  $p = 0.0044$  and  $0.0001$ , respectively).

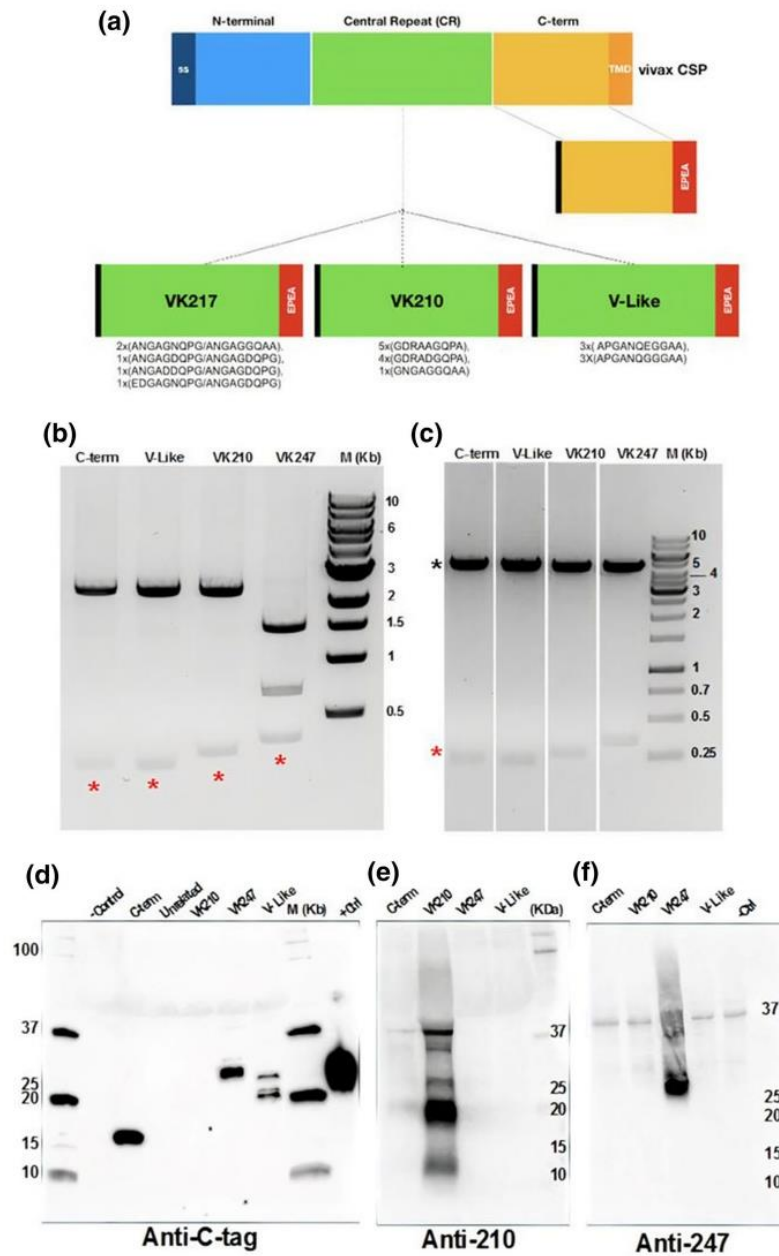
**Design of the vCSP proteins and assessment of protein secretion for purification.** Serological analysis of the immune response to malarial antigens is paramount to establish the immunogenicity of potential vaccine candidates and the immune competence or even the effect of parasite genetic polymorphisms in the immunity of residing populations in a given geographical location. However, most of the studies conduct ELISAS against the full-length protein of interest. Here we sought to dissect the serological immune responses

Epidemiological features	CZS <sup>a</sup>	GJ <sup>b</sup>	ML <sup>c</sup>	Total
	(n = 124)	(n = 87)	(n = 88)	(n = 299)
<b>Gender—N (%)</b>				
Male	65 (52.4%)	45 (51.7%)	44 (50%)	154 (51.5%)
Female	59 (47.6%)	42 (48.3%)	44 (50%)	145 (48.5%)
<b>Malaria exposure—median (IR)</b>				
A.PI	55,5	42,5	107,2	61,4
Age (years)	29.5 (20–45)	33 (22–50)	33.5 (23–42.5)	32 (22–47)
Years of residence on endemic area	29 (19.5–44)	33.5 (23–50)	32.5 (21–43)	31 (21–47)
Years of residence in the present address	20 (6–36)	18 (3–29) <sup>**</sup>	27.5 (12.5–38.5) <sup>b*</sup>	20 (5–36)
Months since the last malaria episode	2.5 (0–60) <sup>b**</sup>	12 (4–48) <sup>***c***</sup>	3.5 (0–22) <sup>b***</sup>	5 (0–36)
Number of malaria episodes on the last year	1 (0–1)	0 (0–1)	1 (0–1.5)	0.5 (0–1)
Number of previous malaria episodes	6 (2–12)	5 (2–10)	10 (5–20)	7 (3–15)
<b>Species causing previous episodes—N (%)</b>				
<i>P. vivax</i>	23 (19%)	16 (18%)	17 (19%)	56 (19%)
<i>P. falciparum</i>	10 (8%)	6 (7%)	0 (0%)	16 (5%)
<i>P. vivax and P. falciparum</i>	68 (55%)	51 (59%)	67 (76%)	186 (62%)
Never infected	1 (0.8%)	6 (7%)	0 (0%)	7 (2%)
Not reported	21 (17%)	8 (9%)	5 (6%)	34 (11%)
<b>Diagnosis—N (%)</b>				
<i>P. vivax</i>	39 (31.5%)	10 (11.5%)	24 (27.3%)	73 (24.4%)
<i>P. falciparum</i>	25 (20.2%)	6 (6.9%)	10 (11.4%)	41 (13.7%)
Mixed	0 (0%)	1 (1.1%)	3 (3.4%)	4 (1.3%)
Negative	60 (48.4%) <sup>b**</sup>	70 (80.5%) <sup>***c***</sup>	51 (58%) <sup>b**</sup>	181 (60.5%)

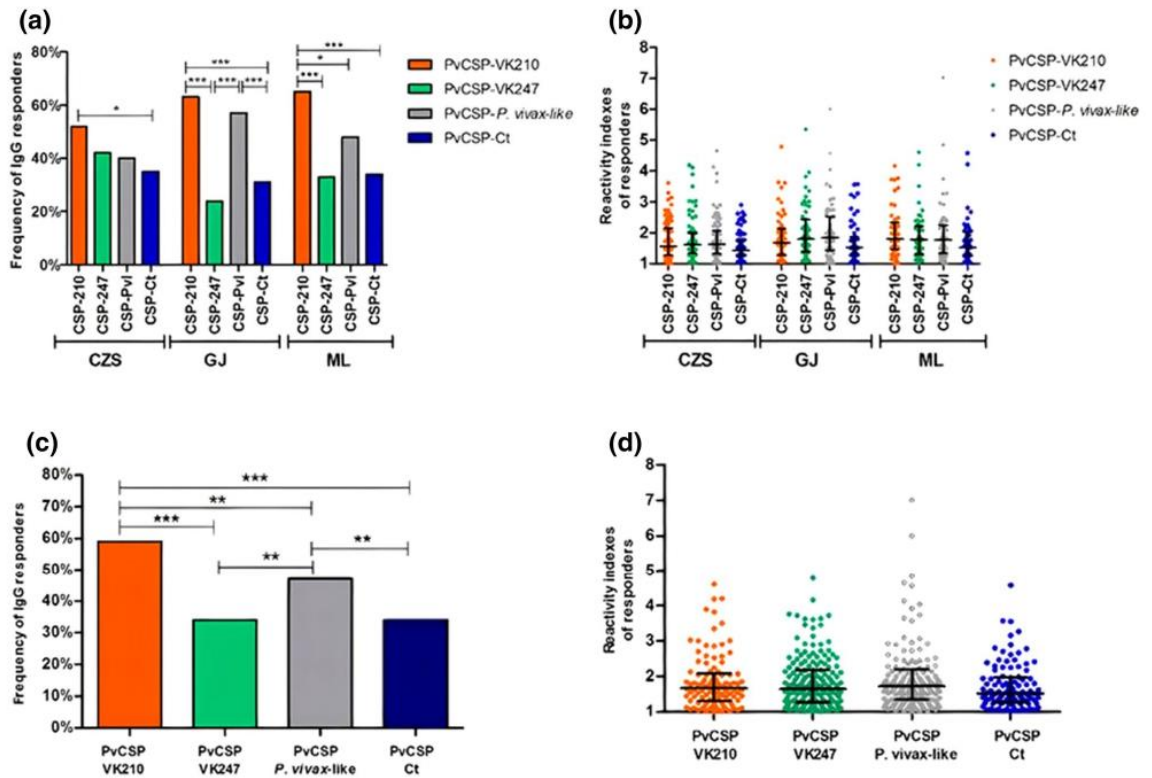
**Table 1.** Epidemiological features of the study population. Values of A.PI. (annual parasitic index), Age, Years of residence in endemic areas, Years of residence in the present address, Months since the last malaria, Number of malaria episodes on the last year and number of previous malaria episodes represent the median (interquartile range). Frequencies were compared by Fisher's test, and other epidemiological parameters were compared by Mann–Whitney test. Upper scripted letters (<sup>a,b,c</sup>) indicate the studied populations (CZS = Cruzeiro do Sul; ML = GJ = Guajará and Mâncio Lima, respectively) and statistical differences were represented by \* (<sup>a</sup>) $p < 0.05$ ; (<sup>b</sup>) $p < 0.005$ ; (<sup>c</sup>) $p < 0.0005$ .

against vivax CSP malaria by constructing expression plasmids encoding the sole central repeats of each of the allelic variants of VK247, VK210 and V-Like, respectively, and the C-terminal region of CSP (Fig. 1). The design of these sub-domain regions is based in the antigenic conformation of the chimeric CSP 210/247 from the Rv21 vaccine<sup>26</sup> which also contains the highly conserved C-Terminal region of vCSP. For the case of the Vivax-Like repeats we used a sequence previously reported<sup>26</sup>. Figure 1a shows a diagrammatic representation of vCSP and the four subunits that were synthesized and enzyme-digested to ligate (Fig. 1b) into the expression plasmid PhLSec. After ligation with the PhLSec backbone, bacterial transformants were double-digested to verify the right size of the transgenes (Fig. 1c). The red and black asterisks denote the specific size of each transgene and the PhLSec backbone, respectively. Upon confirmation of the right clones by enzymatic digestion, plasmids were further verified by Sanger-sequencing. PhLSec plasmids were then transfected into HEK293 cells and supernatant was recovered to assess the secretion capabilities of our c-tagged vCSP subunits. Supernatants were subjected to western blot analysis using a camelid anti-C-Tag antibody (Fig. 1d). Specific bands were detected for the C-term, VK247 and Vivax-Like as well as in the unrelated NS1 beta ladder protein fused to EPEA (c-tag). No bands were detected in the negative untransfected cells or in the unrelated PhLSec plasmid fused to His-tag. However, the anti-C-Tag antibody failed to recognize the VK210 repeats, suggesting a masking effect inflicted by the protein-resolving conditions. To further investigate this masking effect, we used specific monoclonal antibodies (mAb) targeting the VK210 (Fig. 1e) and the VK247 (Fig. 1f) repeats, respectively. By using the anti-210 mAb, we detected a strong signal in the sample that was negative in the C-tag western blot, and not in the other transfectant supernatants, thus confirming the secretion capabilities of VK210 repeats (Fig. 1e). On the other hand, when using the anti-247 antibody, we detected abundant signal in the lane corresponding to the VK247 supernatants, thus confirming the secretion of the VK247 repeats (Fig. 1f). A non-specific band of 35 Kda was detected in all samples. Therefore, the design of the expression plasmids allows the expression and the secretion of the vCSP subunits for a subsequent protein-column purification, to be used as coating agents in the ELISA assays.

**Frequency and magnitude of IgG antibodies to recombinant proteins derived from PvCSP.** We assessed the naturally acquired IgG response against PvCSP recombinant central repeats of PvCSP-VK210, PvCSP-VK247, and PvCSP-*P. vivax*-like, as well as the PvCSP-C terminal region, in 299 exposed individuals.



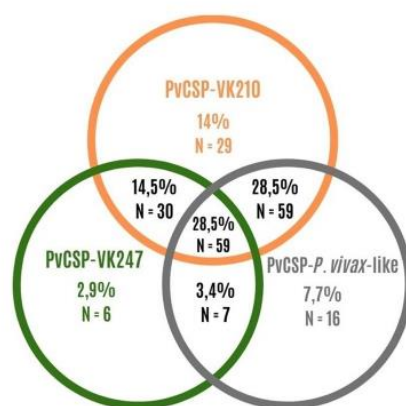
**Figure 1.** Expression of vCSP malarial antigens for protein production. **(a)** Schematic representation of the vivax CSP protein. The C-term portion (yellow) without its transmembrane domain, as well as the 3 different allelic variants from the central repeat region (VK217, VK247 and V-like) were fused to the c-tag epitope (EPEA) to allow purification using a c-tag affinity column (red). Black color represents the exogenous signal sequence contained in the expression plasmid construct. Red asterisk represents the specific size for each construct that were cut from the agarose gel, followed by ligation to the backbone plasmid pHLsec. **(b)** Synthetic DNA sequences carrying such malarial antigens were extracted by double enzymatic digestion (AgeI and KpnI), red asterisk represents the specific size of the coding regions and black asterisk represents the PhLsec backbone. PhLsec plasmid were transfected into HEK293 cells and supernatant was recovered 4 days after transfection. 10 ml of each of the supernatants was subjected to SDS-PAGE and western blot against the anti-C-Tag **(d)**, the anti-210 **(e)**, and the anti-247 **(f)** antibodies.



**Figure 2.** Humoral response against PvCSP recombinant proteins. Frequencies of IgG responders in each studied locality (a); reactivity indexes of responders in the three studied localities (b); overall frequencies of IgG responders (c) and overall reactivity indexes of IgG antibodies of responders (d) to each recombinant protein derived from PvCSP. In (a) and (c), each bar represents the frequency of responders to one of the recombinant proteins (PvCSP-VK210: orange bar; PvCSP-VK247: green bar; PvCSP-*P.vivax-like*: gray bar and PvCSP-Ct: purple bar). Figure 1b,d, each point represents an individual RI against PvCSP recombinant proteins (PvCSP-VK210: orange points; PvCSP-VK247: green points; PvCSP-*P.vivax-like*: gray points and PvCSP-Ct: purple points). Black bars on (b) and (d) represent values of median and interquartile range. RIs higher than 1 are considered responders to the recombinant protein. Frequencies of responders were compared by Fisher’s exact test and RIs were compared by Mann–Whitney test. Significant differences were indicated by \*. (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.005$ ; (\*\*\*)  $p < 0.0005$ .

Firstly, we evaluated the frequency of responders to recombinant PvCSPs in each studied community (Fig. 2a). In Cruzeiro do Sul (CZS), the frequencies of responders to PvCSP allelic variants (PvCSP-VK210, PvCSP-VK247, PvCSP-*P. vivax-like*) were quite similar (52%, 42% and 40%, respectively), while in Guajará (GJ) we observed higher frequencies of responders to PvCSP-VK210 (63%) and PvCSP-*P. vivax-like* (57%) than frequencies of responders to PvCSP-VK247 (24%) ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively) and to PvCSP-Ct (31%) ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0007$ , respectively). Moreover, in Mâncio Lima community (ML), we observed a prevalence of responders to PvCSP-VK210 (65%) when compared to frequency of responders to PvCSP-VK247 (33%,  $p < 0.0001$ ), PvCSP-*P.vivax-like* (48%,  $p = 0.0331$ ) and to PvCSP-Ct (34%,  $p < 0.0001$ ). In relation to the magnitude of response to different recombinant PvCSP among responders, despite differences in epidemiological data and frequencies of responders in each studied location, similar IgG reactivity indexes against PvCSP variants and PvCSP-Ct were observed in all studied populations (Fig. 2b). Based on the absence of statistical differences among IgG reactivity indexes against recombinant proteins in these three studied places, we decided to analyze them as a single population. Responders to PvCSP-VK210 ( $n = 177$ ; 59%) were more prevalent when compared to responders to PvCSP-VK247 ( $n = 102$ , 34%;  $p < 0.0001$ ), to PvCSP-*P. vivax-like* ( $n = 141$ , 47%;  $p = 0.0041$ ) and to PvCSP-Ct ( $n = 101$ , 34%;  $p < 0.0001$ ), followed by responders to PvCSP-*P. vivax-like*, which were more prevalent than those responding to PvCSP-VK247 ( $p = 0.0015$ ) and to PvCSP-Ct ( $p = 0.0011$ ) (Fig. 2c). Despite differences observed in frequencies of IgG responders, the magnitude of IgG responses was similar among responders to PvCSP recombinant proteins. The average RI of responders against PvCSP-VK210 ( $1.84 \pm 0.72$ ), PvCSP-VK247 ( $1.86 \pm 0.77$ ), PvCSP-*P. vivax-like* ( $1.96 \pm 0.95$ ) and PvCSP-Ct ( $1.74 \pm 0.65$ ) did not differ statistically ( $p > 0.05$ ) (Fig. 2d). All samples from healthy Control group were negative to all four recombinant proteins.

Two hundred and seven of individuals (69%) presented IgG antibodies against at least one of recombinant proteins, from these 92% (190) have reported previous *P. vivax* infections, including ongoing infections 23,7%



**Figure 3.** Venn diagram of responders to at least one of the recombinant proteins. In this diagram, values of N and the percentage of responders are demonstrated. Values marked with colors represent individuals that respond exclusively to the indicated protein (orange PvCSP-VK210, green PvCSP-VK247 and gray PvCSP-P. vivax-like). Values in black represent individuals that respond to two or three of the recombinant proteins according to the circles in which values are inserted.

(49). Only 17 individuals never reported previous *P. vivax* episodes and 4 of these (2%) were infected with *P. falciparum*. Among responders, 16.9% of individuals presented antibodies against all four recombinant proteins, 37.7% against three recombinant proteins, 25.6% to two of the recombinant proteins and 19.8% to only one antigen. Inside the group of responders to only one recombinant protein ( $n = 41$ ), PvCSP-VK210 represented 56.1%. Moreover, focusing on humoral immune response to PvCSP variants, 28.5% of responders to at least one of recombinant proteins, responds to the three PvCSP-variants, 14.5% to PvCSP-VK210 and PvCSP-VK247, 28.5% to PvCSP-VK210 and PvCSP-P. vivax-like, 3.4% to PvCSP-VK247 and PvCSP-P. vivax-like, 14% responds only to PvCSP-VK210, 2.9% only to PvCSP-VK247 and 7.7% only to PvCSP-P. vivax-like, as demonstrated in Fig. 3.

In order to evaluate if the infection status could change the antibody profile of recognition, we also assessed the frequency and magnitude of antibodies against the recombinants by the presence/absence of *P. vivax* at the time of blood collection. Among individuals living in endemic areas, 31% ( $n = 92$ ) did not present antibodies to any of the recombinant proteins, these individuals include 28 infected *P. vivax* individuals. We have also selected *P. vivax* infected and non-infected individuals inside the group of 207 recombinant protein responders and compared their frequencies and IgG reactivity indexes. We found out higher frequencies of IgG responders to PvCSP-VK210 and PvCSP-Ct in non-infected individuals ( $p = 0.0086$  and  $p = 0.0117$ , respectively). However, IgG magnitude was similar between these two groups (supplementary figure S1).

**Evaluation of IgG subclass profile against PvCSP variants.** We assessed the overall subclass distribution of the IgG antibody (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) responses among responders to each recombinant protein. Among 177 responders to PvCSP-VK210, 149 individuals (84.2%) presented IgG1 antibodies. This is higher than the frequencies of IgG2 (67.8%,  $p = 0.0005$ ), IgG3 (43.5%,  $p < 0.0001$ ) and IgG4 (5.6%,  $p < 0.0001$ ). Similarly, responders to PvCSP-VK247 ( $n = 102$ ), also had a prevalence of IgG1 (70.6%) over the other IgG subclasses ( $p < 0.0001$ ), followed by IgG2 (33.3%) and similar frequencies of IgG3 (13.7%) and IgG4 (17.6%) ( $p = 0.0015$  and  $p = 0.0155$ , respectively, when compared to IgG2) responders. In contrast, among responders to PvCSP-P. vivax-like ( $n = 141$ ), IgG3 was the most frequent subclass, representing 76.6% of responders ( $p < 0.0001$  as compared to other subclasses), while 33.3%, 19% ( $p = 0.0063$ ) and 25.5% of this group presented IgG1, IgG2 and IgG4 specific antibodies respectively. Lastly, among responders to the C-terminal region of PvCSP (PvCSP-Ct,  $n = 101$ ), we observed a minor frequency of responders to IgG4 (7.9%) than to all other subclasses ( $p < 0.0001$ ). Moreover, similar frequencies of responders to IgG3 (58.4%) and IgG2 (47.5%) were observed, both of them, higher than the observed frequency of responders to IgG1 (25.7%) ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0021$ , respectively) (Fig. 4a).

Concerning the magnitude of response of each IgG subclass against PvCSP, the RIs ranged from 0.15 to 34.32. Focusing on subclasses profile against PvCSP-VK210, IgG1 responders presented higher RIs (median = 2.97; interquartile range = 1.86–4.83) than IgG2 (median = 1.86; interquartile range = 1.39–2.93,  $p < 0.0001$ ), IgG3 (median = 1.2; interquartile range = 1.1–1.6,  $p < 0.0001$ ) and IgG4 responders (median = 1.39; interquartile range = 1.07–1.79,  $p = 0.0002$ ), while responders to IgG3 and to IgG4 presented similar RI and both subclasses had lower RIs than IgG2 ( $p < 0.0001$  and 0.018, respectively). Moreover, despite the high prevalence of IgG1 responders against PvCSP-VK247, the RIs of IgG1 responders (median = 1.43; interquartile range = 1.2–2.28) were only higher than IgG2 (median = 1.28; interquartile range = 1.07–1.66;  $p = 0.0359$ ) and IgG4 (median = 1.23; interquartile range = 1.08–1.69;  $p = 0.0436$ ), although RIs of IgG3 responders (median = 1.2; interquartile range = 1.07–2.34) were similar to other IgG subclasses. Besides, concerning the reactivity to PvCSP-P. vivax-like, the RIs of IgG3 responders (median = 1.76; interquartile range = 1.31–2.38) were higher than that of IgG1 (median = 1.15; interquartile range = 1.09–1.3,  $p < 0.0001$ ), of IgG2 (median = 1.04; interquartile range = 1.02–1.15,  $p < 0.0001$ ) and of IgG4 (median = 1.23; interquartile range = 1.05–1.54,  $p < 0.0002$ ). Finally, considering the responsiveness to

PvCSP-C-terminal region, we observed no differences among the RIs of responders to IgG1 (median = 1.16; interquartile range = 1.08–1.39); IgG2 (median = 1.29; interquartile range = 1.12–1.82); IgG3 (median = 1.15; interquartile range = 1.06–1.25) and IgG4 (median = 1.18; interquartile range = 1.06–1.73).

Furthermore, a higher IgG1 RI response against PvCSP-VK210 was observed when compared to RI of IgG1 against PvCSP-VK247 ( $p < 0.0001$ ) and to PvCSP-*P. vivax*-like ( $p < 0.0001$ ), and a higher IgG3 reactivity to PvCSP-*P. vivax*-like than to PvCSP-VK210 ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 4b). When we selected and compared infected and non-infected responders to each subclass per recombinant protein we did not find differences in frequencies and reactivity indexes (supplementary figure S1).

**Evaluation of associations between exposition/protection factors and humoral immune response to PvCSP.** In order to investigate the influence of epidemiological parameters on the responsiveness to PvCSP, we compared the epidemiological data of responders and non-responders to each one of the PvCSP recombinant proteins. Responders to PvCSP-VK210, VK247 and *P. vivax*-like presented higher median of age ( $p = 0.007$ ;  $p = 0.003$ ;  $p = 0.007$ , respectively) and time of residence in endemic area ( $p = 0.005$ ;  $p = 0.005$  and  $p = 0.015$ , respectively) than non-responders to each protein. No statistical difference was found between responders and non-responders to PvCSP-Ct (Fig. 5a–d).

To identify factors associated with the magnitude of response to each antigen, we investigated the existence of correlations between RIs against recombinant proteins and epidemiological data. Firstly, we observed a tendency of correlation between age and time of residence in endemic area with RIs of IgG antibodies against PvCSP-VK210 ( $p = 0.007$ ,  $r = 0.159$  and  $p = 0.005$ ,  $r = 0.165$ ; respectively) and against PvCSP-*P. vivax*-like ( $p = 0.026$ ,  $r = 0.131$  and  $p = 0.037$ ,  $r = 0.124$ ; respectively). In addition, RIs of IgG antibodies against PvCSP-VK247 presented a tendency of correlation with the number of previous malaria episodes (NPME) ( $p = 0.024$ ,  $r = 0.135$ ).

Besides, searching for associations between subclass profile against PvCSP-variants and epidemiological data, we identified that the number of previous malaria episodes positively correlated with the IgG1 levels to PvCSP-VK210 ( $p = 0.008$ ,  $r = 0.204$ ) and IgG3 levels to PvCSP-VK247 ( $p = 0.0007$ ,  $r = 0.278$ ). For PvCSP-*P. vivax*-like responders, the RIs of IgG2 were directly correlated with both, age ( $p = 0.002$ ,  $r = 0.266$ ) and time of residence in endemic area ( $p = 0.001$ ,  $r = 0.294$ ). No significant correlations were observed between epidemiological data and humoral response to PvCSP-Ct.

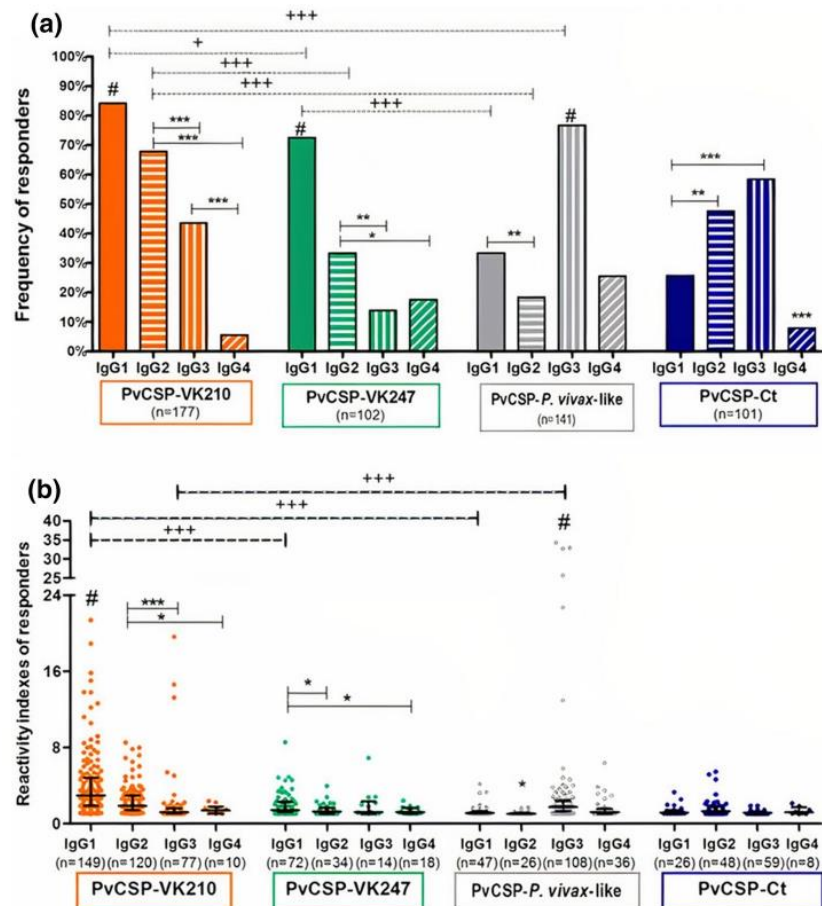
**Characteristics of responders to the three major PvCSP variants.** In order to investigate the effect of responsiveness against all PvCSP variants on protection against malaria, we compared the epidemiological data of responders to all three PvCSP variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like;  $N = 59$ ) with those of individuals who did not respond to at least one of these variants ( $N = 240$ ). Samples of responders to three variants have a significantly longer time of residence in endemic area (TREA) (median = 38; interquartile range = 24.5–52.5), on average 6 years more than individuals that did not respond (median = 30; interquartile range = 21–44) ( $p = 0.017$ ). Moreover, the RIs of cytophilic antibodies of responders to three PvCSP variants inversely correlated with months since the last malaria (MSLM). Reactivity indexes of IgG1 against PvCSP-VK210 ( $p = 0.047$ ;  $r = -0.276$ ), IgG1 ( $p = 0.041$ ;  $r = -0.285$ ) and IgG3 ( $p = 0.029$ ;  $r = -0.303$ ) against PvCSP-*P. vivax*-like inversely correlated with MSLM (Fig. 6a,c,d). However, as it is shown in Fig. 6b, RIs of IgG1 against PvCSP-VK247 directly correlated with this same parameter ( $p = 0.041$ ;  $r = 0.285$ ).

## Discussion

Previous works have proposed that CSP variants of *P. vivax*, besides having variations in the repetitive portion of the protein, can differ from each other in aspects such as geographical distribution, intensity of transmission, vectorial competence, immune response, response to treatment and drug resistance<sup>23,27–29</sup>. Such aspects must be considered to *P. vivax* vaccine development<sup>22</sup>. Therefore, multidisciplinary studies characterizing PvCSP variants epidemiology may advance in the development of an effective vaccine against *P. vivax*.

In our study, we evaluated and characterized the humoral IgG response to the PvCSP variant repeats (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) and the C-terminal region, in a population consisting of 299 individuals naturally exposed to *P. vivax* malaria, living in Acre, a state of the malaria endemic Brazilian Amazon. From 207 responders to at least one of recombinant proteins, 190 described previous *P. vivax* infections and just 49 were infected with this species. This result suggests that production of antibodies against PvCSP extends for past infections. This feature was previously demonstrated in a study conducted by Longley et al. at a low transmission region in Thailand, where the majority of study population was not infected with *P. vivax* but still presented detectable IgG levels<sup>30</sup>. Other study of a yearlong cohort also demonstrated IgG positivity and magnitude persistence over 1 year period in absence of qPCR-detectable blood stage *P. vivax* infections<sup>31</sup>. Our results demonstrated that, PvCSP-VK210 presented the highest prevalence of responders, followed by PvCSP-*P. vivax*-like and PvCSP-VK247. Frequency profiles were already described in different Amazon regions and they are consistent with our results. Oliveira-Ferreira et al. have observed the same profile of IgG responders to these PvCSP variants (More responders to PvCSP-VK210, followed by PvCSP-*P. vivax*-like and PvCSP-VK247) in Candeias do Jamari in Rondônia state, in 2004<sup>32</sup>. However, the mentioned paper found lower frequencies in comparison to our study, which could be related to the use of synthetic peptides as antigens in their ELISA assays. In 2000, Machado and Póvoa evaluated the distribution of PvCSP variants of *P. vivax* from three endemic areas (Belém, Macapá and Porto Velho), and again found a dominance of prevalence similar to ours<sup>33</sup>. Years later, Storti-Melo et al. assessed the frequency of PvCSP variants using PCR/RFLP samples from five states of the Brazilian Amazon, Acre, Amapá, Mato Grosso, Pará and Rondônia. Again the profile of distribution of the variants was similar to ours<sup>34</sup>. Among facts that may explain observed prevalences, we highlight the distinct susceptibility of *Anopheles* mosquitoes to different PvCSP variants, which depends on the recognition of specific ligands of the peritrophic

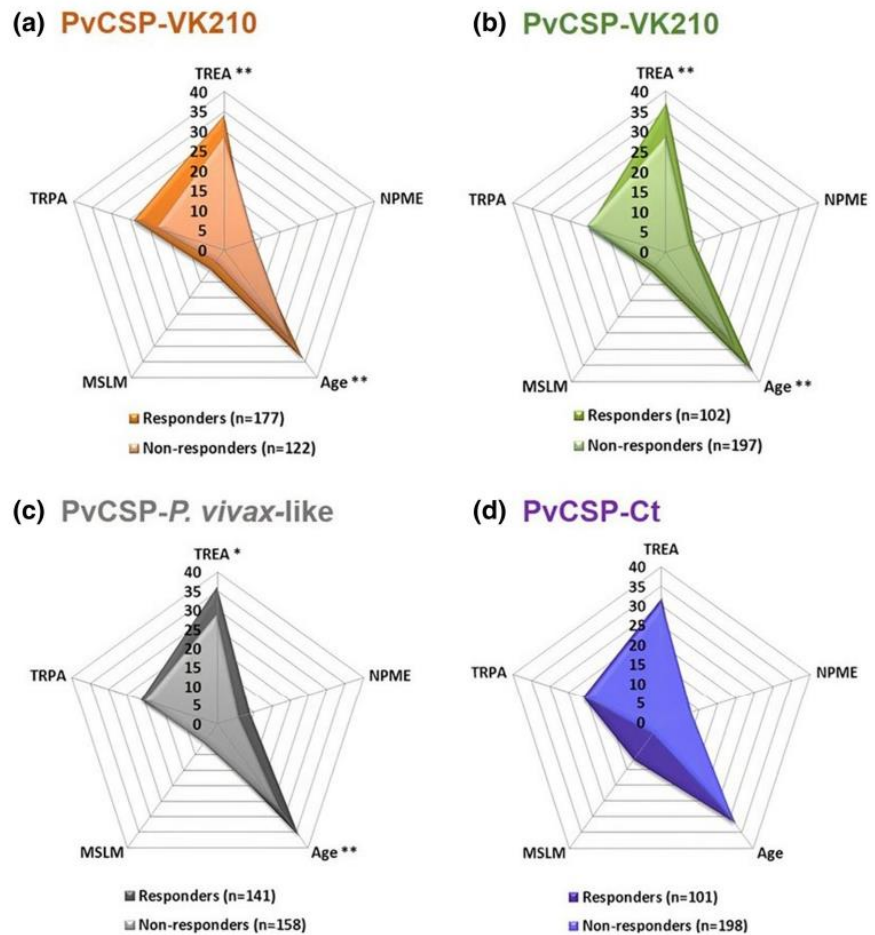




**Figure 4.** Frequency of IgG subclass responders (a) and their reactivity indexes (b) against the recombinant PvCSP proteins in the studied population. Points represent an individual RI against PvCSP recombinant proteins (PvCSP-VK210: orange points; PvCSP-VK247: green points; PvCSP-*P. vivax*-like: gray points and PvCSP-CT: purple points). The red traced line represents the cutoff, RIs higher than 1 are considered responders to the recombinant protein. Frequencies of responders were compared by Fisher's exact test and RIs were compared by Mann-Whitney test. Significant differences among subclasses were indicated by \* and significant differences among responsiveness to each protein were indicated by +; (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ . In this figure # means that the subclass is different from all the others against the same protein.

matrix by ookinete surface proteins, triggering migration or entrapment of the parasite<sup>35</sup>. A study that used dissected blood fed infected mosquitoes and ELISA assays, demonstrated a preferential development of PvCSP-VK210, as compared to that of PvCSP-VK247, in *An. aquasalis* and *An. darlingi*, in the state of Pará<sup>27</sup>. Moreover, frequencies of IgG responders to PvCSP recombinant proteins corroborate the co-circulation of all three *P. vivax* variants in Amazon region<sup>23,24,36</sup>. Besides, the higher frequency of antibodies to VK210 are in according to studies that described this variant as the most common in Amazon, while VK247 was rarely reported as single infection<sup>22,23,34</sup>. In our study we found 28 *P. vivax* infected patients that are non-responders to recombinant proteins and this was already described in literature. In 2018, Oliveira-Ferreira performed a study to evaluate seroprevalence to CSP and demonstrated that not only Brazilian naturally exposed individuals but also *P. vivax* infected ones, were unresponsive to peptides of this protein. In this same study, two specific allelic groups were associated with absence of antibodies against PvCSP (HLA-DRB1\*01 and HLA-DQB1\*05)<sup>37</sup>. In this scenario, we believe our findings can be explained by well documented associations of the immune response with specific HLA alleles against malaria antigens<sup>38,39</sup>.

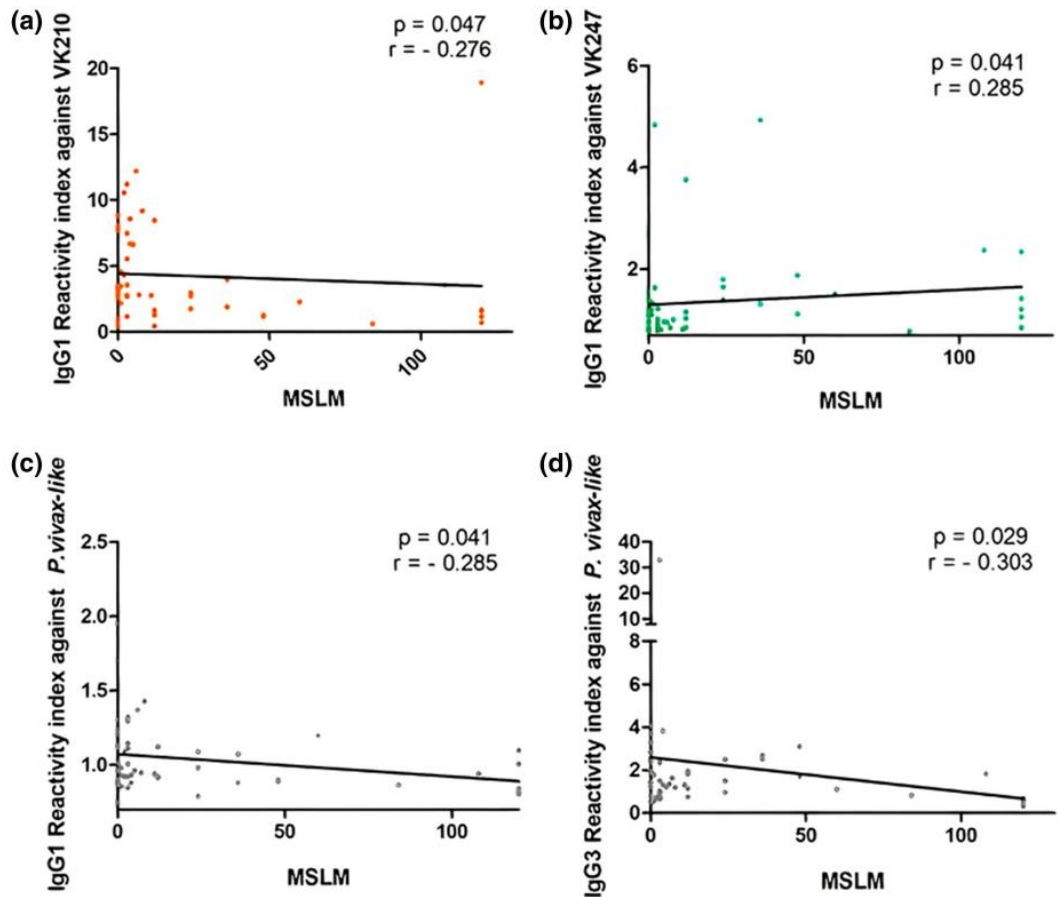
Concerning the functionality of the IgG subclasses, we did observe a predominance of cytophilic antibodies to PvCSP variants, once that IgG1 was the prevailing subclass against VK210 and VK247, and IgG3 was the principal IgG subclass of antibodies to *P. vivax*-like. Interestingly, this preponderance of cytophilic antibodies was previously described to PvCSP and PvTRAP, suggesting that this profile could be associated to the adaptive immune



**Figure 5.** Comparison of epidemiological parameters between responders and non-responders to each *PvCSP* recombinant protein. TREA = Time of residence in endemic area (years), NPME = Number of previous malaria episodes, MSLM = Months since last malaria and TRPA = Time of residence in the present address (years). Epidemiological data of responders and non-responders to each one of the recombinant proteins were compared by Mann–Whitney test.

response against preerythrocyte stage proteins<sup>40</sup>. Moreover, in places where malaria is endemic and the local population has had several malaria episodes through the years, there are evidences that the premonition (immune condition characterizing clinical protection as reflected by the absence of fever and presence of infection at low densities of parasitemia) is reached after repeated infections, due to the presence of both cytophilic antibodies (IgG1 and IgG3) and memory cells<sup>41–43</sup>. In this context, despite that we not found any significant association between cytophilic antibodies and protection in this study, we believe that these antibodies could act in synergy with other antibodies against preerythrocytic targets, promoting a protective effect. However, it is important to highlight that previous works have already demonstrated heterologous reactivity occurring in antibodies elicited against CSP antigens of *P. vivax* and *P. falciparum*<sup>44</sup>, so, despite the fact that the majority of our recombinant protein responders got in touch with *P. vivax*, we can't affirm that these antibodies are exclusively to *P. vivax*.

For the purpose of elucidating the influence of epidemiological factors in humoral response to *PvCSP* variants and C-terminal region, we correlated induced RIs of IgG and its' subclasses with the studied population parameters. We found out that IgG reactivity indexes of *PvCSP-VK210* and *PvCSP-P. vivax-like* presented a trend to increase with time of exposition to infection. This tendency could be explained by both, the preferential development of *PvCSP-VK210* in predominant species of anopheles mosquitoes in Amazon and the widely geographical distribution of these variants when compared to *PvCSP-VK247* (suggested to have a lower geographic adaptation in Brazil)<sup>27,34</sup>. These data may explain why people living longer in these endemic regions tend to have higher IgG reactivity indexes against *PvCSP-VK210* and *PvCSP-P. vivax-like*, since they get in touch more frequently with these two variants. On the other hand, IgG reactivity indexes of *PvCSP-VK247* presented a tendency of correlation with the number of previous malaria episodes, which is also coherent with



**Figure 6.** Correlation of RIs of cytophilic IgG subclasses with months since the last malaria (MSLM). (a) Correlation of IgG1 RIs against PvCSP-VK210 with MSLM. (b) Correlation of IgG1 RIs against PvCSP-VK247 with MSLM. (c) Correlation of IgG1 RIs against PvCSP-*P. vivax-like* with MSLM. (d) Correlation of IgG3 RIs against PvCSP-*P. vivax-like* with MSLM.

the aforementioned condition, since individuals that have more infections will probably have more chances to get in touch with this less geographically distributed variant. In our results we have considered three areas as a single one. However, looking separately to these areas, Mâncio Lima and Cruzeiro do Sul demonstrate a similar/higher prevalence of the variant PvCSP-VK247 on PvCSP-*P. vivax-like* as a previous work has demonstrated in other Brazilian endemic areas<sup>24</sup>.

We have then checked possible correlations between subclass reactivity indexes and epidemiological parameters. Our findings suggest a cumulative effect on IgG1 reactivity indexes against PvCSP-VK210 as a result of previous malaria episodes. On the other hand, PvCSP-VK247 IgG3 RI's presented a direct correlation with the NPME. Differently of the PvCSP variants, the RI's of IgG and its' subclasses able to recognize the C-terminal region of the protein were not able to correlate with any of the epidemiological parameters described. These findings are consistent with those reported by Arévalo-Herrera describing high levels of cytophilic antibodies capable to recognize fragments from both PvCSP N-terminal and repeated regions, based on immunizations with long synthetic peptides in phase I clinical assays, while the C-terminal region was not immunogenic in humans<sup>45</sup>. In addition, despite immunogenic in mice, N or C terminals only (i.e. lacking either VK210 or 247 repeat sequences) also failed to induce protective immunity<sup>26</sup>. Since Kurtovic et al. pointed complement activation by antibodies as an important mechanism of anti-sporozoite human immunity, one of the possible mechanisms that might explain the non-immunogenic profile of PvCSP-Ct is by means of the complement fragment C3d, capable to limit the anti-CSP C-terminal flanking sequence-specific antibody response by masking epitopes in this region of the molecule. Thus, C3d binding to CSP C-terminal region may represent a mechanism based on the exploitation of the innate immune response by the parasite in order to suppress the development of an acquired immune response against a conserved region of the protein<sup>46</sup>.

In agreement with the previous discussed results, comparison of epidemiological parameters of responders and non-responders to each one of the recombinant proteins presented statistical differences of age and TREA for the three PvCSP allelic variants. Again, only PvCSP-Ct did not present such a difference and induced low

responses in natural exposure conditions. This finding could suggest that the production of specific antibodies against the C-terminal region is not conditioned by the TREA or parasite exposure. In fact, the production of antibodies to PvCSP-Ct may be related to the ability of each individual's immune system to circumvent a possible mechanism of parasite-mediated evasion, like we previously suggested.

From all of the studied population (299) individuals, 59 presented specific IgG antibodies to all of PvCSP variants. When compared to individuals that did not respond to at least one of the variants, these individuals presented significantly longer TREA (mean of 6 years). Furthermore, this same group presents inverse correlations between cytophilic RI's (IgG1 against PvCSP-VK210; IgG1 and IgG3 against PvCSP-*P. vivax-like*) and MSLM, suggesting that these specific antibodies could, somehow, represent markers of recent infection. On the other hand, only IgG1 RI's of PvCSP-VK247 were directly correlated with MSLM, implying that these specific antibodies may be important for a protective immune response.

In conclusion, despite the limitations in sample size and study design, our work indicates that IgG positivity and magnitude against PvCSP variants can persist from past infections in the studied population, even in the absence of an ongoing malaria episode. The profile of responders to PvCSP allelic variants and its geographical distribution are still compatible with scientific literature, with dominance of PvCSP-VK210, followed by PvCSP-*P. vivax-like* and PvCSP-VK247. The immune response raised against the recombinant proteins studied here, were mediated, predominantly, by cytophilic antibodies, which have a relevant role to trigger a protective immune response. Conversely, C-terminal region, does not seem to be the best option in vaccine design due its low-immunogenic properties and absence of correlation with epidemiological parameters and protection indicatives. Lastly, taking into account the limitations of the number of individuals enrolled in our study and the unique features of studied population, which is historically exposed to *P. vivax* and *P. falciparum* simultaneously, we can not exclude the possibility of heterologous reactivity of antibodies against *P. vivax* CSP variants. Therefore, other epidemiological studies regarding *P. vivax* allelic variants in other areas are encouraged and essential to address this question and increase the knowledge about the serological landscapes in endemic regions, which is fundamental to develop a global *P. vivax* vaccine.

## Methods

**Study area and volunteers.** The cross-sectional cohort study included 299 individuals from three different communities with malaria transmission in Acre state: Cruzeiro do Sul (n = 124), Guajará (n = 87) and Mâncio Lima (n = 88). Samples of 53 individuals living in non endemic areas of Rio de Janeiro and never exposed to malaria were the control group. Samples and survey data were collected from June to August of 2016. Informed consent was obtained from all donors by written declaration. The study was reviewed and approved by the Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil.

**Epidemiological survey.** To evaluate the potential influence of clinical and exposure features on immunity response against PvCSP variants, the donors were interviewed prior the blood sampling. Questions related to personal exposure to malaria, such as time of residence in transmission areas, previous malaria episodes, use of prophylactic measures, symptoms and personal knowledge of malaria transmission were done with all study participants. The answers were stored in Epi-Info databank for subsequent analysis (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Written informed consent was obtained from all adult donors or from parents of donors in the case of minors.

**Malaria diagnosis and blood sampling.** Blood samples were collected by venipuncture in heparin tubes and centrifuged (350×g, 10 min) to plasma separation and storage at - 20 °C to ship to Laboratório de Imunoparasitologia, Fiocruz—RJ. Thin and thick blood smears were stained and analyzed for malaria parasites. The diagnosis were done by examination of 200 fields at 1,000× magnifications under oil-immersion and two research experts in malaria diagnosis examined all slides. Individuals positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were treated using the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

**Recombinant PvCSP variants expression in HEK-293 T cells.** As previously described by Longley et al.<sup>31</sup>, the *P. vivax* sequences used were PvCSPVK210 of Belem strain (GenBank accession number P08677), PvCSPVK247 of Papua New Guinea (GenBank accession number M69059), PvCSPVivax-like of Papua New Guinea (GenBank accession number L13724.1) and PvCSP C-terminal region from Salvador I strain (NCBI Reference Sequence XP\_001613068.1). Each one of the domains contained in the multi-variant chimeric recombinant protein used in the Rv21 vaccine described by Salman et al.<sup>26</sup> was synthesized and codon-optimized using the Geneart service (ThermoFisher), as follows;

C-terminal: NNEGANAPNEKSVKEYLDKVRATVGTEWTPCSVTCGVGVRVRRVNAANKKPEDLTLDN-LETDVCTMDK.

VK210: (5x(GDRAAGQPA), 4x(GDRADGQPA), 1x(GNGAGGQAA)); VK247: (2x(ANGAGNQPG/ANGAGGQAA), 1x(ANGAGDQPG/ANGAGDQPG), 1x(ANGADDQPG/ANGAGDQPG), 1x(EDGAGNQPG/ANGAGDQPG)).

Finally, Vivax-like repeats, with a sequence 3x(APGANQEGGAA), 3x(APGANQGGGAA), was obtained from the genebank accession number: AAA18616.

DNA fragments encoding each of the vCSP regions were cloned in the expression vector pHLsec, which is flanked by the chicken β-actin/rabbit β-globin hybrid promoter with a signal secretion sequence and with a modification of a C-tag instead of a His-tag tail.

For expression and purification of vCSP malarial antigens, the codon-optimized coding regions were cloned into the pHLsec vector, as previously described<sup>47</sup>, which is flanked by the chicken  $\beta$ -actin/rabbit  $\beta$ -globin hybrid promoter with a signal secretion sequence and a C-tag (EPEA). The pHLsec plasmids (500  $\mu$ g) were transfected in HEK-293 cells using polyethyleneimine (PEI) in roller bottles (surface area of 2,125 cm<sup>2</sup>) under standard cell culture conditions. Five days after transfection, cells were discarded and media was filtered through 0.22  $\mu$ m disposable filters. The secreted protein was purified from the supernatant by affinity chromatography (C-tag column), using the Äkta Start chromatography system and eluted with 2.0 M MgCl<sub>2</sub> and 20 mM Tris, pH 7.0. Finally, the eluted protein was dialysed using Slide-A-Lyzer™ cassette (Fisher Scientific) against 1× PBS.

**Western Blot.** Supernatants from transfected HEK293 cells were boiled at 100 °C for 5 min in laemli buffer. Equal amounts cell supernatants were resolved by SDS/PAGE and transferred to PVDF membranes. Blots were blocked with 1× PBS-Tween- 5% milk and incubated with an anti-C-Tag antibody (CaptureSelect™ Biotin Anti-C-tag Conjugate at 1:2,000 dilution, supernatants from a MRA-185 hybridoma cell line (2E10.E9) that recognize the VK247 repeats, and supernatants from a MRA-184 hybridoma cell line (2F2) that recognize the VK210 repeats, followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibody (1:5,000). Chemiluminescence (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA) was visualized using the BioRad ChemiDoc SRS device.

**Antibody assays.** Anti-PvCSP specific antibodies against recombinant VK210, VK247, Vivax-like and C terminal region (CT), were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described by Matos et al.<sup>48</sup>. Briefly, MaxiSorp 96-well plates (Nunc, Rochester, NY, USA) were coated overnight with 1.0  $\mu$ g/ml of each recombinant protein. Plates were washed and blocked for 1 h at 37 °C. After blocking, plasma samples (1:100 in PBS-Tween-BSA 5%) were incubated in duplicate wells during 1 h. After three washing steps, bound antibodies were detected with anti-human IgG-PE (Sigma, St. Louis) and followed by addition of o-phenylenediamine and hydrogen peroxide. Plates were read at 492 nm using a SpectraMax 250 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The results for total IgG were expressed as reactivity indexes (RIs), which were calculated by the mean optical density (O.D.) of an each tested sample divided by the cut-off, number expressed by the mean optical density of 10 non-exposed control individuals' samples plus 3 standard deviation (cut-offs values: VK210 = 0.208, Vivax-like = 0.268, VK247 = 0.260 and Ct = 0.245). These 10 non-exposed control individuals' corresponded to 10 higher DO's found in 53 control individuals tested (VK210 = 0.126; 0.131; 0.137; 0.143; 0.146; 0.146; 0.149; 0.153; 0.183; 0.184; Vivax-like = 0.147; 0.175; 0.185; 0.189; 0.191; 0.202; 0.210; 0.210; 0.220; 0.230; VK247 = 0.139; 0.146; 0.149; 0.168; 0.172; 0.178; 0.188; 0.193; 0.215; 0.220; Ct = 0.129; 0.131; 0.137; 0.148; 0.156; 0.182; 0.183; 0.189; 0.192; 0.196). Subjects were scored as responders to PvCSP variants if the RI of IgG against each one of the recombinant proteins was higher than 1. Additionally, the RIs of IgG subclasses for each one of the proteins, were evaluated on responders of each PvCSP variant. The same method was done, using peroxidase-conjugated goat anti-human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (Sigma, St. Louis) (cut-offs—VK210 IgG1 = 0.158, IgG2 = 0.168, IgG3 = 0.194 and IgG4 = 0.315, Vivax-like IgG1 = 0.060, IgG2 = 0.053, IgG3 = 0.110 and IgG4 = 0.065, VK247 IgG1 = 0.234, IgG2 = 0.337, IgG3 = 0.288 and IgG4 = 0.439 and Ct IgG1 = 0.161, IgG2 = 0.308, IgG3 = 0.191 and IgG4 = 0.284).

**Statistical analysis.** Statistical analyzes were done in GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.). Normality test were done in all variables using the one-sample Kolmogorov-Smirnoff test. The Dunn's test was used to compare RIs of IgG against recombinant PvCSP variants in studied groups. Uncorrected Fisher's plus LSD was done to access the differences in proportions of IgG, IgG subclass. Correlations between immune response and epidemiological parameters were evaluated by Spearman rank test. A two-sided p value < 0.05 was considered significant.

**Ethics approval and consent to participate.** Written consent for use of plasma samples and survey data were obtained in accordance to the revised Declaration of Helsinki. Both collection and consent protocols were under approval of Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248).

#### Data availability

The present manuscript includes all datasets generated for this study.

Received: 25 October 2019; Accepted: 2 August 2020

Published online: 20 August 2020

#### References

- Collins, W. E. & Contacos, P. G. Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by X-irradiated sporozoites. *Nat. New Biol.* **236**, 176–177 (1972).
- Gwadz, R. W., Cochrane, A. H., Nussenzweig, V. & Nussenzweig, R. S. 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.* **57**(Suppl 1), 165–173 (1979).
- Herrington, D. et al. Successful immunization of humans with irradiated malaria sporozoites: Humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 539–547 (1991).
- Mota, M. M. & Rodriguez, A. Migration through host cells: The first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell. Microbiol.* **6**, 1113–1118. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00460.x> (2004).
- Kappe, S. H., Buscaglia, C. A. & Nussenzweig, V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 29–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.011603.150935> (2004).

6. Huang, Y. T., Lu, X. M., Jin, X. B. & Zhu, J. Y. Research advances on circumsporozoite protein of *Plasmodium*. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.* **30**, 238–242 (2012).
7. Rodriguez-Galan, A. *et al.* An in vitro assay to measure antibody-mediated inhibition of *P. berghei* sporozoite invasion against *P. falciparum* antigens. *Sci. Rep.* **7**, 17011. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17274-5> (2017).
8. Garçon, N., Heppner, D. G. & Cohen, J. Development of RTS, S/AS02: A purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* **2**, 231–238. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.2.231> (2003).
9. PATH. *Malaria Vaccine Initiative* (2017).
10. Vandoolaeghe, P. & Schuerman, L. The RTS, S/AS01 malaria vaccine in children 5 to 17 months of age at first vaccination. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 1481–1493. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1236689> (2016).
11. Ouattara, A. & Laurens, M. B. Vaccines against malaria. *Clin. Infect. Dis.* **60**, 930–936. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu954> (2015).
12. Zubairi, A. B. *et al.* Severe *Plasmodium vivax* malaria in Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1851–1854. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130495> (2013).
13. Llanos-Chea, F. *et al.* Characteristics of travel-related severe *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in individuals hospitalized at a Tertiary Referral Center in Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 1249–1253. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0652> (2015).
14. Nadkar, M. Y., Huchche, A. M., Singh, R. & Pazare, A. R. Clinical profile of severe *Plasmodium vivax* malaria in a tertiary care centre in Mumbai from June 2010–January 2011. *J. Assoc. Physicians India* **60**, 11–13 (2012).
15. Medina-Morales, D. A., Montoya-Franco, E., Sanchez-Aristizabal, V. D., Machado-Alba, J. E. & Rodriguez-Morales, A. J. Severe and benign *Plasmodium vivax* malaria in Embera (Amerindian) children and adolescents from an endemic municipality in Western Colombia. *J. Infect. Public Health* **9**, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.09.001> (2016).
16. Price, R. N. *et al.* Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis* **14**, 982–991. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70855-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70855-2) (2014).
17. Rijken, M. J. *et al.* Chloroquine resistant vivax malaria in a pregnant woman on the western border of Thailand. *Malaria J.* **10**, 113. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-113> (2011).
18. Graf, P. C. *et al.* Failure of supervised chloroquine and primaquine regimen for the treatment of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Malaria Res. Treat.* **2012**, 936067. <https://doi.org/10.1155/2012/936067> (2012).
19. Arnot, D. E. *et al.* Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: Gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science* **230**, 815–818 (1985).
20. Rosenberg, R. *et al.* Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* **245**, 973–976 (1989).
21. Qari, S. H. *et al.* Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. *Lancet* **341**, 780–783 (1993).
22. Souza-Neiras, W. C. *et al.* *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: A limited variation or new subspecies with major biological consequences?. *Malaria J.* **9**, 178. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-178> (2010).
23. Machado, R. L. & Póvoa, M. M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**, 377–381 (2000).
24. Arruda, M. E., Zimmerman, R. H., Souza, R. M. & Oliveira-Ferreira, J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 367–371 (2007).
25. Yadava, A. *et al.* A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. *Infect. Immun.* **75**, 1177–1185. <https://doi.org/10.1128/IAI.01667-06> (2007).
26. Salman, A. M. *et al.* Rational development of a protective *P. vivax* vaccine evaluated with transgenic rodent parasite challenge models. *Sci. Rep.* **7**, 46482. <https://doi.org/10.1038/srep46482> (2017).
27. da Silva, A. N., Santos, C. C., Lacerda, R. N., Machado, R. L. & Póvoa, M. M. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 547–550 (2006).
28. Gonzalez-Ceron, L. *et al.* Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. *Infect. Immun.* **67**, 410–412 (1999).
29. Branquinho, M. S. *et al.* Infection of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of Sao Vicente and Juquitiba, Sao Paulo. *Pan Am. J. Public Health* **2**, 189–193 (1997).
30. Longley, R. J. *et al.* Asymptomatic *Plasmodium vivax* infections induce robust IgG responses to multiple blood-stage proteins in a low-transmission region of western Thailand. *Malaria J.* **16**, 178. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1826-8> (2017).
31. Longley, R. J. *et al.* Acquisition and longevity of Antibodies to *Plasmodium vivax* preerythrocytic antigens in Western Thailand. *Clin. Vaccine Immunol.* **23**, 117–124. <https://doi.org/10.1128/0162-1225.00501-15> (2016).
32. Oliveira-Ferreira, J. *et al.* HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop.* **92**, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.02.011> (2004).
33. Machado, R. L. & Póvoa, M. M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**, 377–381 (2000).
34. Storti-Melo, L. M. *et al.* *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**, 672–678. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.07.018> (2009).
35. Gonzalez-Ceron, L. *et al.* *Plasmodium vivax*: Impaired escape of Vk210 phenotype ookinetes from the midgut blood bolus of *Anopheles pseudopunctipennis*. *Exp. Parasitol.* **115**, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.06.001> (2007).
36. Bonilla, J. A., Validum, L., Cummings, R. & Palmer, C. J. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Pvmsp and Pvmsp1 in Guyana, South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 830–835 (2006).
37. Pereira, V. A. *et al.* Evaluating seroprevalence to circumsporozoite protein to estimate exposure to three species of *Plasmodium* in the Brazilian Amazon. *Infect. Dis. Poverty* **7**, 46. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0428-1> (2018).
38. Hill, A. V. *et al.* Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* **352**, 595–600. <https://doi.org/10.1038/352595a0> (1991).
39. Lima-Junior, J. C. *et al.* Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3alpha and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. *PLoS ONE* **7**, e36419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036419> (2012).
40. Lopez, C., Yepes-Perez, Y., Hincapie-Escobar, N., Diaz-Arevalo, D. & Patarroyo, M. A. What Is known about the immune response induced by *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates?. *Front. Immunol.* **8**, 126. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00126> (2017).
41. Baird, J. K. *et al.* Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 65–76 (1991).
42. Perignon, J. L. & Druilhe, P. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**(Suppl 2), 51–53 (1994).
43. Doolan, D. L., Dobano, C. & Baird, J. K. Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 13–36. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08> (2009).

44. Hall, C. E. *et al.* Mosquito bite-induced controlled human malaria infection with *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* generates immune responses to homologous and heterologous preerythrocytic and erythrocytic antigens. *Infect. Immunity* <https://doi.org/10.1128/IAI.00541-18> (2019).
45. Arevalo-Herrera, M. *et al.* Antibody-mediated and cellular immune responses induced in naive volunteers by vaccination with long synthetic peptides derived from the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **84**, 35–42. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.09-0507> (2011).
46. Bergmann-Leitner, E. S. *et al.* C3d binding to the circumsporozoite protein carboxy-terminus deviates immunity against malaria. *Int. Immunol.* **17**, 245–255. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh205> (2005).
47. Rodrigues-da-Silva, R. N. *et al.* *Plasmodium vivax* cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites: Naturally acquired humoral immune response and B-Cell epitope mapping in Brazilian Amazon inhabitants. *Front. Immunol.* **8**, 77. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00077> (2017).
48. Matos, A. D. S. *et al.* Antibody responses against *Plasmodium vivax* TRAP recombinant and synthetic antigens in naturally exposed individuals from the Brazilian Amazon. *Front. Immunol.* **10**, 2230. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02230> (2019).

### Acknowledgements

We are grateful to all individuals who participated in this study for their cooperation and generous donation of blood, which made this study possible. CTDR, JOF and JCLJ receive a “Research Productivity Fellowship” from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and CTDR and JCLJ are recipients of a grant from Faperj as *Cientistas do Nosso Estado* and *Jovem Cientista do Nosso Estado*, respectively. This work was also funded by the CNPq/Papes (Programa de Apoio Pesquisa Estratégica em Saúde), Inovabio grant program (BIO-004-FIO-17-2-11-Bio-Manguinhos/Fiocruz) and Fiocruz (PAEF II, IOC-023-FIO-18-2-47). The following reagent was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: Hybridoma 2E10.E9 Anti-*Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP), MRA-185, and the Hybridoma 2F2 Anti-*Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP), MRA-184, contributed by Elizabeth Nardin.

### Author contributions

Study designing: J.C.L.-J., A.R.-S. and L.P.-R. Performed experiments, data analysis and manuscript preparation: I.F.-S., R.R.-d-S. and C.L.-C. Performed experiments: A.S.-M. Field work support: B.O.-P., R.M.-S., P.R.-T. and C.T.-R. Recombinant cloning and protein expression: C.L.-C. Protein purification and QC assays: C.L.-C., K.H., A.M.-G., Y.-C.K. and E.O.-F. Manuscript review and data analysis: J.O.-E., C.T.-R., J.L.-J., A.R.-S., I.F.-S., R.R.-d-S. and C.L.-C.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.


### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70893-3>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to J.d.L.-J.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

## Anexo XII – Coautoria em artigo

### **Neotropical primate models for malaria research: 25 years of collaboration between Laboratory of Malaria Research (IOC, Fiocruz) and Centro Nacional de Primatas (IEC, SVS)**

Lilian Rose Pratt-Riccio, Evelyn Kety Pratt Riccio, Cesare Bianco-Junior, Francisco Acácio Alves, **Barbara de Oliveira Baptista**, Paulo Renato Rivas Totino, José Augusto Pereira Carneiro Muniz, Paulo Henrique Gomes de Castro, Leonardo José de Moura Carvalho, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro.



# Uso de modelos de primatas neotropicais para pesquisa em malária: um histórico dos 25 anos de colaboração entre o Laboratório de Pesquisa em Malária (IOC, Fiocruz) e o Centro Nacional de Primatas (IEC, SVS)

## Neotropical primate models for malaria research: 25 years of collaboration between Laboratory of Malaria Research (IOC, Fiocruz) and Centro Nacional de Primatas (IEC, SVS)

Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>1,2</sup>, Evelyn Kety Pratt Riccio<sup>1,2</sup>, Cesare Bianco-Junior<sup>1,2</sup>, Francisco Acácio Alves<sup>1,2</sup>, Bárbara de Oliveira Baptista<sup>1,2</sup>, Paulo Renato Rivas Totino<sup>1,2</sup>, José Augusto Pereira Cameiro Muniz<sup>3</sup>, Paulo Henrique Gomes de Castro<sup>3</sup>, Leonardo José de Moura Carvalho<sup>1,2</sup>, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Malária, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>2</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>3</sup> Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, Pará, Brasil

### RESUMO

A malária continua sendo um dos principais problemas globais de saúde pública, sendo responsável pela morte de 409.000 pessoas anualmente, principalmente devido à infecção por *Plasmodium falciparum*. Assim, o desenvolvimento de uma vacina tem sido uma das prioridades de pesquisa para o enfrentamento desse problema. Não existe vacina licenciada contra a malária e, embora mais de 30 antígenos tenham sido identificados como candidatos vacinais, nenhum deles gerou uma perspectiva sólida de que uma vacina possa estar disponível nos próximos anos. Torna-se fundamental a pesquisa de candidatos vacinais mais imunogênicos, eficazes e seguros. Os primatas neotropicais dos gêneros *Saimiri* e *Aotus* são os modelos recomendados para estudos experimentais em malária, visto que podem ser infectados por plasmódios humanos. O Laboratório de Pesquisa em Malária (LabMal) da Fundação Oswaldo Cruz estuda os mecanismos de defesa e doença na malária e utiliza os modelos *Saimiri* e *Aotus* para a avaliação pré-clínica de antígenos candidatos à vacina e estudos de mecanismos de aquisição de imunidade e fisiopatogenia da malária. Para a realização dos estudos, o LabMal estabeleceu uma parceria com o Centro Nacional de Primatas (CENP) do Instituto Evandro Chagas, que resultou na ampliação das colônias de *Saimiri sciureus*, colocando o CENP entre as raras instituições no mundo que dispõem desse recurso para pesquisa. O presente trabalho é um retrospecto dos resultados obtidos durante 25 anos de parceria entre o LabMal e o CENP na utilização de primatas *Saimiri* e *Aotus* como modelos de estudo para pesquisa e desenvolvimento de uma vacina antimalárica.

**Palavras-chave:** Malária; *Plasmodium falciparum*; Modelos Animais; Experimentação animal; *Saimiri*; *Aotus*.

### ABSTRACT

Malaria remains a significant public health problem and, responsible for 409,000 deaths annually, mainly due to infection by *Plasmodium falciparum*. Thus, the development of an effective vaccine has been a research priority to address the problem. There is no licensed vaccine, and although more than 30 antigens have been identified as candidates, none of them has yet generated a solid prospect that an effective vaccine may be available in the coming years. Therefore, it is essential to search for new, more immunogenic, more effective and safer vaccine candidates. The neotropical, non-human primates (NHP) of the genera *Saimiri* and *Aotus* are recommended as experimental models for the study of human malaria because these animals can be infected with the *Plasmodium* that infect humans. The Laboratory of Malaria Research (LabMal, Fiocruz) studies the mechanisms of defense and disease in malaria and uses the *Saimiri* and *Aotus* experimental models for preclinical evaluation of antimalarial vaccine candidates and for conducting studies of immunity acquisition mechanisms and physiopathogenesis of malaria. To carry out the studies, LabMal established a partnership with the Centro Nacional de Primatas (CENP) of the Instituto Evandro Chagas, which resulted in the expansion of *Saimiri sciureus* colonies, placing CENP among the few institutions in the world that have this resource for malaria research. The present paper is a retrospective of the results obtained during 25 years of partnership between LabMal and CENP in the use of *Saimiri* and *Aotus* as study models for research and development of an antimalarial vaccine.

**Keywords:** Malaria; *Plasmodium falciparum*; Animal Models; *Saimiri*; *Aotus*.

### Correspondência / Correspondence:

Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro

Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Malária

Av. Brasil, 4365. Bairro: Manguinhos. CEP: 21040-360 – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Tel.: +55 (21) 3865-8145

E-mail: malaria@fiocruz.br

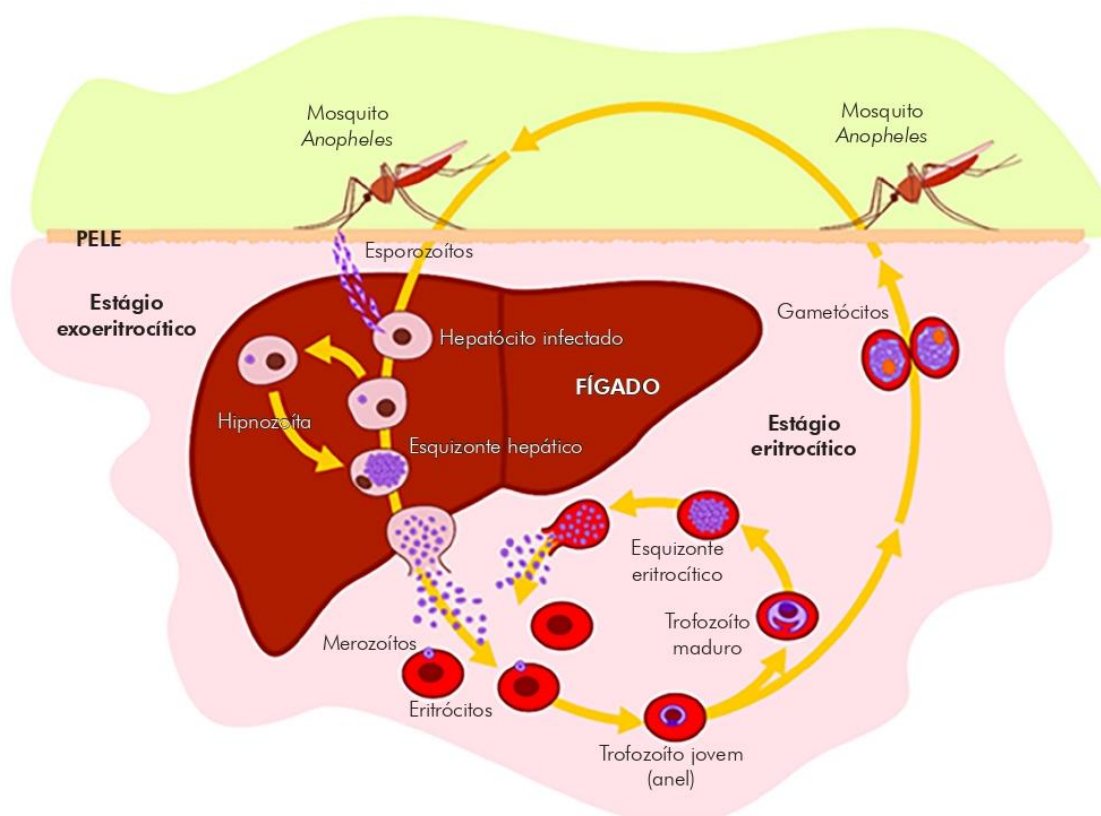


## INTRODUÇÃO

A malária é indiscutivelmente a parasitose mais importante em humanos ainda nos dias de hoje, e apesar dos avanços no seu controle, fatores como a demora no diagnóstico, a resistência dos parasitos aos antimaláricos e a resistência do inseto vetor aos inseticidas dificultam o controle da doença. Assim, a malária continua sendo um dos principais problemas globais de saúde pública, estando presente em 91 países das regiões tropicais e subtropicais do mundo, pondo em risco cerca de 61% da população mundial. Sete espécies de *Plasmodium* (Figura 1) causam doenças em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi* e *Plasmodium simium*. Globalmente, *P. falciparum* e *P. vivax* são responsáveis pela maioria dos casos<sup>1,2</sup>. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2019, foram registrados 229 milhões de casos no mundo com 409.000 mortes,

a maioria em crianças menores de 5 anos de idade<sup>2</sup>. As mortes por malária são, em sua grande maioria, de indivíduos que contraem a infecção por *P. falciparum* (99,7%). A infecção por *P. knowlesi* resulta em uma malária de evolução muito rápida, que pode ser fatal com bastante frequência<sup>3,4,5,6</sup>.

Em 2019, o Brasil registrou cerca de 22% dos casos de malária das Américas<sup>2</sup>, tendo sido notificados 155.638 casos, quase todos (99,6%) na Região Amazônica, área endêmica da doença, que inclui os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nos outros estados, os casos (~0,4% do total) são frequentemente importados da Região Amazônica ou de outros países onde ocorre a transmissão. A proporção de casos importados/casos autóctones, em torno de 9/1, diminuiu nos últimos anos depois do aumento da prevalência de casos autóctones de transmissão zoonótica de *P. simium* em regiões de Mata Atlântica no sudeste brasileiro<sup>7</sup>.



Fonte: Adaptado de Lima-Junior JC, Pratt-Riccio LR. Major histocompatibility complex and malaria: focus on *Plasmodium vivax* infection. Front Immunol. 2016;7:13. Doi: 10.3389/fimmu.2016.00013.

A infecção no homem se inicia quando fêmeas do mosquito *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, inoculam na pele os esporozoítos acumulados em suas glândulas salivares. Essas formas se movem ativamente até encontrarem os vasos linfáticos ou sanguíneos, vias pelas quais chegam ao fígado, onde invadem os hepatócitos, iniciando a fase exoeritrocítica. Os esporozoítos se diferenciam em esquizonte hepáticos com milhares de merozoítos que são liberados na corrente sanguínea e são capazes de invadir eritrócitos. No ciclo do *Plasmodium vivax* e do *Plasmodium ovale*, nem todos os esporozoítos que infectam os hepatócitos entram em processo de esquizogonia. Ao invés disso, eles se desenvolvem em formas hepáticas latentes, chamadas hipnozoítas, permitindo as recaídas tardias da doença. A invasão dos merozoítos nos eritrócitos dá início ao ciclo eritrocítico da infecção, fase na qual ocorrem os sintomas clínicos da malária. Dentro do eritrócito, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens e maduros, que se multiplicam, dando origem a esquizonte repletos de merozoítos sanguíneos. Com o amadurecimento do esquizonte, ocorre a lise dos eritrócitos, liberando os merozoítos sanguíneos, que invadirão novos eritrócitos. Após alguns ciclos, alguns merozoítos se diferenciam em formas eritrocíticas sexuadas, os gametócitos femininos (macrogametócitos) e os gametócitos masculinos (microgametócitos), que, ao serem ingeridos por um mosquito durante um repasto sanguíneo, dão início ao ciclo esporogônico. Nessa fase, após subsequentes diferenciações celulares, os esporozoítos que se desenvolvem atingem as glândulas salivares do inseto, possibilitando continuidade do ciclo parasitário.

**Figura 1** – Ciclo evolutivo do *Plasmodium*

O controle da malária depende do combate ao vetor e do diagnóstico e tratamento oportunos<sup>2</sup>. No entanto, a eficácia das intervenções está sob ameaça devido à crescente resistência dos plasmódios aos antimaláricos e dos vetores aos inseticidas atualmente disponíveis, além do surgimento de isolados resistentes aos derivados de artemisinina<sup>8,9,10,11,12,13</sup>. Assim, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária tem sido uma das prioridades de pesquisa para o enfrentamento desse problema, e a OMS definiu o objetivo ambicioso de licenciar uma vacina que seja pelo menos 75% eficaz contra a malária clínica até 2030<sup>14</sup>.

Não existe ainda vacina licenciada disponível contra o *P. falciparum*, espécie que está associada às formas mais graves e letais da doença<sup>15,16</sup>. Embora mais de 30 antígenos tenham sido identificados como candidatos à vacina, muitos dos quais já foram testados em ensaios pré-clínicos e clínicos até de fase III, até o momento nenhum deles gerou a perspectiva sólida de que uma vacina verdadeiramente eficaz possa estar disponível nos próximos anos<sup>17,18,19,20</sup>.

Criada em 1987, a RTS,S/AS01 é a mais avançada vacina contra a malária por *P. falciparum* em desenvolvimento. A RTS,S/AS01 está atualmente em ensaio clínico de fase III e, em 2019, começou a implementação piloto em países endêmicos para avaliar a segurança e o impacto na mortalidade em populações de crianças no Gana, Quênia e Malawi<sup>21,22</sup>. Entretanto, em vários ensaios clínicos realizados, a vacina mostrou proteção parcial em adultos, crianças e bebês, além de apresentar uma variação preocupante na eficácia contra a malária clínica (12,5% a 86%)<sup>23,24,25,26,27,28</sup>. Além disso, testes conduzidos em fase III, em sete países subsaarianos, mostraram eficácia variável da vacina em 11 locais (40–77%)<sup>28,29</sup>. Portanto, ainda é fundamental a pesquisa de novos candidatos vacinais mais imunogênicos, mais eficazes e seguros.

Para se avaliar imunogenicidade, inocuidade e capacidade protetora de uma candidata vacinal contra qualquer patógeno humano, é necessária a utilização de uma variedade de modelos animais. Em geral, os primeiros ensaios são feitos em animais de laboratório de pequeno porte, como camundongos, ratos e coelhos, pela facilidade de obtenção de quantidade razoável de espécimes e material biológico a preços acessíveis. Entretanto, resultados obtidos nesses modelos podem não refletir a situação no homem e não são, portanto, facilmente extrapoláveis.

Pesquisas envolvendo primatas não humanos (PNH) têm desempenhado um papel crítico em muitos dos avanços médicos e científicos nas últimas décadas. PNH são usados devido às semelhanças com os humanos em termos de fisiologia, neuroanatomia, reprodução, desenvolvimento, cognição e complexidade social. Essas semelhanças sugerem que os dados obtidos em PNH são mais válidos em comparação com outros modelos<sup>30,31,32,33,34</sup>.

Pela sua proximidade filogenética com o homem, os grandes PNH Hominoidea (chimpanzés, gorilas, orangotangos e gibões) seriam os ideais para estudos pré-clínicos de vacinas<sup>31,35</sup>. Entretanto, a dificuldade de obtenção de tais animais para experimentação se deve ao fato de que eles: 1) estão em sua maioria ameaçados na natureza; 2) são de grande porte e possuem baixa taxa de fecundidade e longo ciclo de vida e; 3) têm alto custo de manutenção em cativeiro, acarretando impedimentos muitas vezes intransponíveis para seu uso experimental. Uma melhor opção seria a utilização de macacos do Velho Mundo, como o *Rhesus* (*Macaca mulatta*), o *Cynomolgus* (*Macaca nemestrina*) ou os macacos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*). Todavia, apesar de serem mais acessíveis que os anteriores, também são animais de porte e longevidade consideráveis, sendo cara a sua manutenção.

Os primatas do Novo Mundo são uma opção bem mais razoável para estudos vacinais. Em geral, esses animais são de pequeno porte e não estão, em sua maioria, ameaçados na natureza. Entre as espécies utilizadas em pesquisa biomédica, pode-se citar os dos gêneros *Aotus* (macaco-da-noite), *Saimiri* (macaco-de-cheiro), *Cebus* (macaco prego) e variedades de saguis, como o *Callithrix jacchus* (mico-estrela).

Os primatas neotropicais dos gêneros *Saimiri* e *Aotus* são os modelos recomendados pela OMS para estudos experimentais em malária, especialmente para estudos vacinais<sup>35,36,37,38</sup>. A principal vantagem dos primatas neotropicais *Saimiri* e *Aotus* – animais de muito menor porte e abundantes na natureza – é que podem ser infectados, sob determinadas condições, por plasmódios humanos como o *P. falciparum*, o *P. vivax* e o *P. malariae*. Isso permite a realização de estudos capazes de trazer informações impossíveis de serem obtidas em outros modelos. Por exemplo, os modelos de malária murina utilizam plasmódios próprios de roedores, com suas características específicas. Assim, apesar de informativos, esses sistemas estão muito distantes do que podem ser as interações de um parasito humano com seu hospedeiro. Desse modo, a possibilidade de estudar o próprio parasito-alvo em um animal filogeneticamente próximo ao homem traz vantagens óbvias. A susceptibilidade à infecção por plasmódios humanos traz outra vantagem aos modelos *Saimiri* e *Aotus*, pois permite que, em ensaios vacinais, além das avaliações clássicas de imunogenicidade e inocuidade das formulações-teste, seja possível verificar a capacidade protetora dos candidatos vacinais estudados por meio de experimentos de desafio, o que não é o caso em macacos como o *Rhesus*, filogeneticamente mais próximo ao homem e também utilizável em estudos de imunogenicidade e inocuidade. Assim, primatas neotropicais vêm sendo usados para a avaliação de potenciais candidatos vacinais e para o estudo da fisiopatologia das formas graves da malária causada por *P. falciparum*.

Embora recomendados pela OMS, esses modelos também apresentam desvantagens. Uma das principais limitações é a necessidade de esplenectomia para atingir parasitemias altas e consistentes<sup>39</sup>. A resposta imune contra as formas eritrocíticas do *Plasmodium* é amplamente mediada por células residentes no baço<sup>40,41,42</sup> e esse órgão tem papel importante na resposta imune durante a infecção. Portanto, a esplenectomia cirúrgica radical representa uma forte limitação para o teste de vacinas contra a malária, já que as próprias respostas imunológicas que as vacinas pretendem provocar podem ser afetadas pela intervenção.

O Laboratório de Pesquisa em Malária (LabMal) do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ), estuda, desde 1984, os mecanismos de defesa e doença na malária, trabalhando na avaliação de vacinas antimaláricas em primatas não humanos desde 1997. O LabMal tem interesse na exploração dos modelos *Saimiri* e *Aotus* não apenas para avaliação pré-clínica de antígenos candidatos à vacina antimalárica, mas também para a condução de estudos de mecanismos de aquisição de imunidade e de fisiopatogenia da malária. Para a realização dos estudos, o LabMal estabeleceu uma parceria com o Centro Nacional de Primatas (CENP), Instituto Evandro Chagas (IEC, Ananindeua, Pará), que resultou, como desdobramento dos projetos, na ampliação das colônias de *Saimiri sciureus*, colocando o CENP, juntamente com o Departamento de Primatologia do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ), entre as raras instituições no mundo que dispõem desse recurso em quantidade e qualidade necessária para apoiar a pesquisa em malária. A ampliação da colônia se operacionalizou à custa de capturas realizadas em parceria entre técnicos da Fiocruz, CENP e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

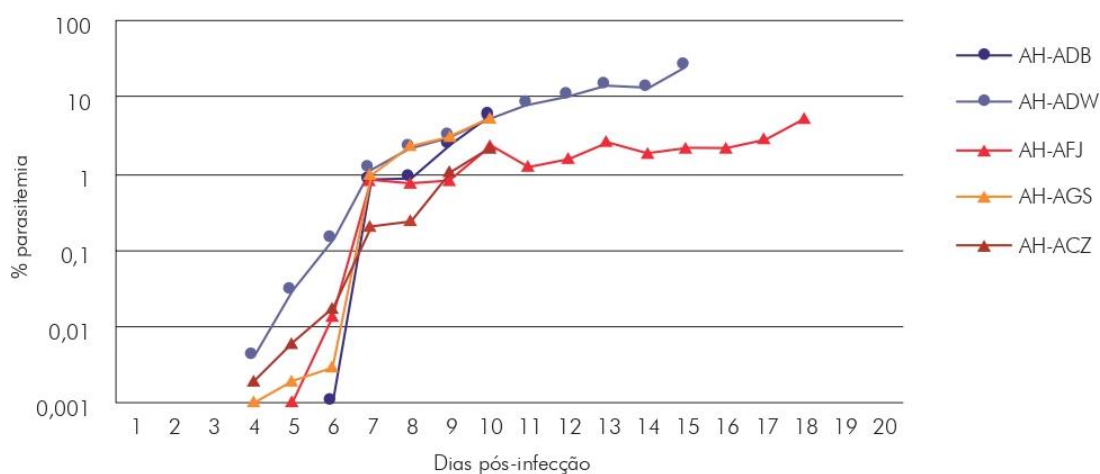
Renováveis. No ICTB, a extensão da colônia deveu-se, sobretudo, à cessão de mais de duas centenas de primatas neotropicais da espécie *S. sciureus* pelo Institut Pasteur de Cayenne (Guiana Francesa).

No presente trabalho, foram descritos os resultados obtidos durante 25 anos de colaboração entre o LabMal e o CENP, na utilização de PNH dos gêneros *Saimiri* e *Aotus* como modelos de estudo para a pesquisa e o desenvolvimento de uma vacina antimalárica humana.

## DESCRIÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE MACACOS AOTUS INFULATUS À INFECÇÃO PELO P. FALCIPARUM

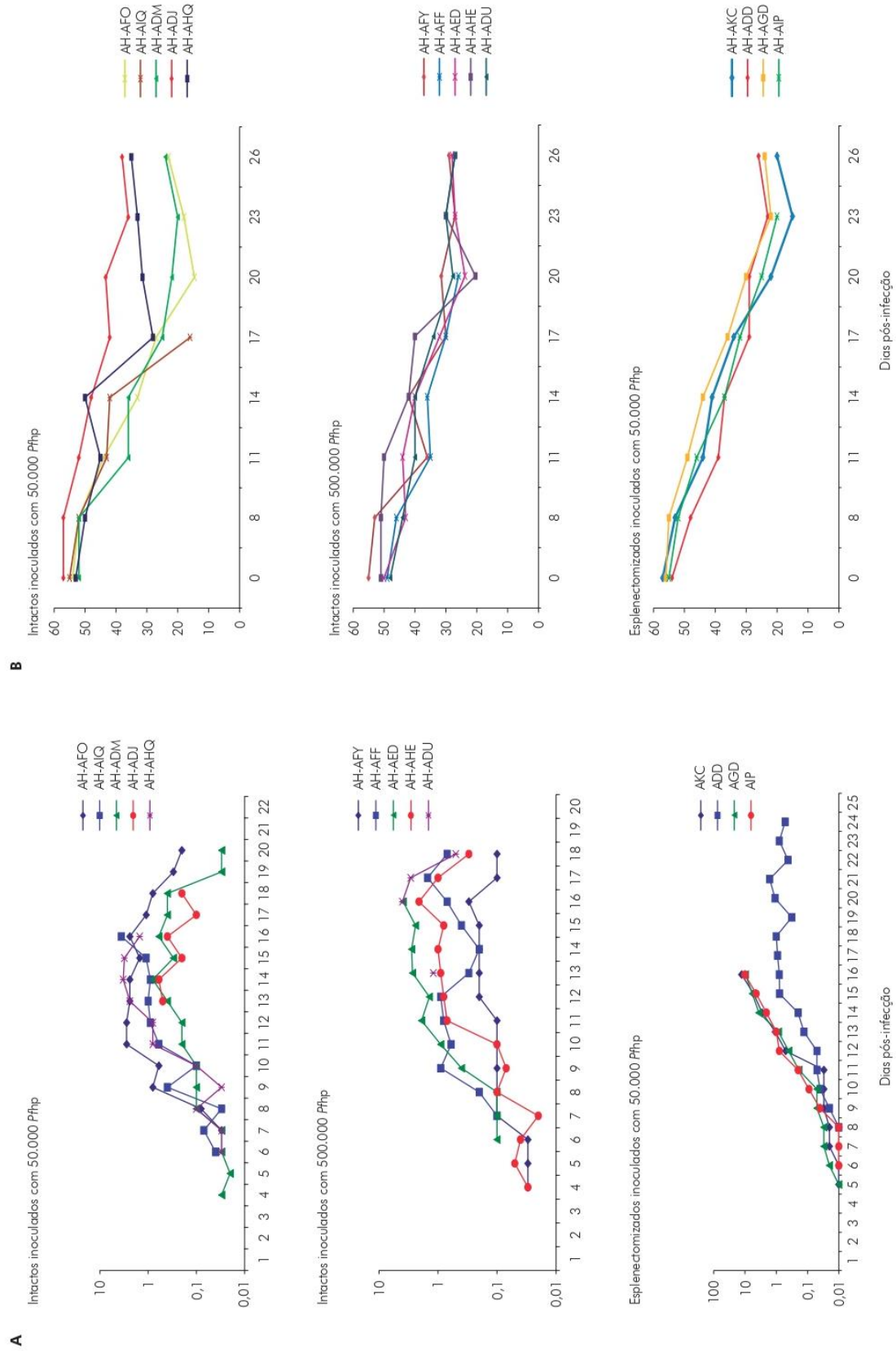
A espécie *Aotus griseimembra*, do norte da Colômbia, é altamente susceptível à infecção por *Plasmodium* nos estágios esporozoíto e eritrocitário<sup>43,44</sup>; porém, a dificuldade na sua obtenção tem levado à avaliação de outras espécies do gênero *Aotus* como modelos alternativos para estudos experimentais em malária humana. Assim, o LabMal avaliou a susceptibilidade dos primatas neotropicais *A. infulatus*, abundantes na Amazônia brasileira, à infecção experimental por *P. falciparum*.

Cinco macacos *Aotus* (dois esplenectomizados e três intactos), foram inoculados com  $10^6$  hemácias parasitadas por *P. falciparum* (Pfhp) cepa FVO provenientes de um *Aotus* doador infectado. Tanto os *Aotus* esplenectomizados quanto os intactos apresentaram parasitos no sangue a partir do dia três ou quatro. A parasitemia subiu nos dois grupos de modo semelhante nos primeiros dias até atingir valores próximos a 1% no dia sete (Figura 2), mostrando que tanto os animais intactos quanto os esplenectomizados foram susceptíveis à infecção por *P. falciparum* e podem representar um modelo alternativo para estudos experimentais em malária<sup>45</sup>.



Os macacos foram inoculados com  $1 \times 10^6$  de hemácias parasitadas por *P. falciparum* cepa FVO. Esplenectomizados: AH-ADB e AH-ADW; Intactos: AH-AFJ, AH-AGS e AH-ACZ.

**Figura 2** – Curso de parasitemia em *A. infulatus* esplenectomizados ou intactos



**Figura 3** – Curso de parasitemia (A) e hematócrito (B) em primatas A. *infulatus* intactos (não esplenectomizados) inoculados com 50.000 ou 500.000 hemácias parasitadas por *P. falciparum* (Pfhsp) e esplenectomizados inoculados com 50.000 hemácias parasitadas por *P. falciparum* (Pfhsp)

Outro dado importante foi a observação de que os animais esplenectomizados não foram capazes de controlar o crescimento do parasito, desenvolvendo uma alta parasitemia, sendo necessário o tratamento com mefloquina. Por outro lado, os animais não esplenectomizados conseguiram manter a parasitemia em níveis mais baixos por longos períodos, mas desenvolveram uma anemia grave<sup>46</sup>. O desenvolvimento dessa complicação, que já foi descrita para outras espécies de *Aotus* durante a infecção por *P. falciparum*<sup>47,48,49</sup>, faz de *A. infulatus* um modelo potencial não só para ensaios vacinais, mas também para estudos da patogenia da anemia grave. Entretanto, esse experimento utilizou um número restrito de animais, não permitindo conclusões definitivas. Assim, o LabMal avaliou o curso de infecção em *A. infulatus* por formas sanguíneas de *P. falciparum*, utilizando diferentes inóculos, em um número maior de animais, e a frequência de acometimento de animais por anemia grave decorrente dessa infecção<sup>45</sup>. Quatorze macacos *A. infulatus* (quatro esplenectomizados e 10 intactos) foram inoculados com *Pfhp* cepa FVO proveniente de um *Aotus* doador infectado. O grupo de 10 animais intactos foi dividido em dois subgrupos de cinco animais cada e inoculados com 50.000 ou 500.000 *Pfhp*. Os animais esplenectomizados receberam um inóculo de 50.000 *Pfhp*. Os *Aotus* intactos, tanto os que receberam o inóculo de 50.000 *Pfhp* quanto os que receberam o inóculo de 500.000 *Pfhp*, mostraram um padrão similar de crescimento parasitário (Figura 3A). Apesar dos animais terem conseguido controlar a parasitemia, nove dos 10 macacos apresentaram redução de 45 a 72% no valor do hematócrito (Figura 3B). Três dos quatro *Aotus* esplenectomizados inoculados com 50.000 *Pfhp* não conseguiram controlar a parasitemia (Figura 3A) e apresentaram uma queda de mais de 50% nos valores do hematócrito inicial (Figura 3B).

Depois de avaliar os eventos resultantes de uma infecção primária, procurou-se avaliar também as características de infecções secundárias. Assim, três meses após o tratamento da primeira infecção, todos os animais receberam  $10^6$  *Pfhp*. Justifica-se o inóculo elevado ao se considerar que os animais estariam semi-ímmunes e poderiam estar resistentes a essa infecção secundária. Duas inoculações posteriores com um inóculo menor ( $10^5$  *Pfhp*) foram efetuadas quatro e dois meses após a segunda e a terceira inoculações, respectivamente. Objetivou-se assim reforçar a imunidade dos animais ao parasito (uma vez que os animais se mostraram bastante resistentes já na segunda inoculação) para posterior obtenção de soro hiperímune para ensaios imunológicos. Os *Aotus* intactos submetidos a infecções repetidas com parasitos homólogos tornaram-se rapidamente e progressivamente resistentes à infecção e ao desenvolvimento de anemia grave.

Esses dados mostram que o primata neotropical *A. infulatus* é susceptível ao desenvolvimento de anemia grave devido à infecção por *P. falciparum*, de forma independente da presença do baço ou da

parasitemia, tornando-os bons modelos de estudos experimentais em malária humana, especialmente no que diz respeito à patogênese de anemia grave<sup>45,46,50</sup>.

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES PARA ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE DE PRIMATAS AOTUS E SAIMIRI

Apesar de *Aotus* e *Saimiri* serem os modelos mais adequados para estudos em malária, a carência de reagentes comerciais específicos dificulta a avaliação da resposta imune em ensaios pré-clínicos vacinais e o estudo de patogenia da malária, representando uma desvantagem importante na utilização desses modelos. O grupo do LabMal produziu reagentes específicos para análise da resposta humoral, que aumentou enormemente a sensibilidade das medidas realizadas com ensaios de ELISA e de imunofluorescência com soro de *Saimiri* e *Aotus*<sup>51</sup>. Com a obtenção de reagentes específicos para análise de resposta humoral, decidiu-se que uma abordagem semelhante poderia ser aplicada ao desenvolvimento de reagentes para análise de resposta celular nesses modelos, uma vez que isso permitiria uma avaliação mais refinada das respostas imunes nesses animais.

Dessa forma, o LabMal se propôs a desenvolver ferramentas moleculares específicas das espécies *Saimiri* e *Aotus* e utilizá-las para avaliar a expressão gênica de moléculas relacionadas à resposta imune, tais como citocinas, quimiocinas, marcadores de ativação, diferenciação e morte celular. A disponibilização dessas ferramentas permite uma avaliação mais aprofundada da resposta imune durante imunizações e infecções maláricas experimentais utilizando essas espécies como modelos. E poderá permitir ainda a identificação e a caracterização de processos imunes durante a infecção, por exemplo, de mecanismos que levam à desestruturação de órgãos linfoides com intensa ativação, proliferação e morte celular e pouca diferenciação, fenômenos que podem contribuir para a baixa eficácia da resposta imune na malária. O conhecimento mais aprofundado desses fenômenos em modelos que refletem melhor a infecção humana poderá gerar informações cruciais para a compreensão dos mecanismos de imunopatogenia da malária humana.

Para isso, um painel de 31 moléculas do sistema imune, entre citocinas, quimiocinas, marcadores de ativação celular e de apoptose, foi selecionado: IFN $\gamma$ , TNF, LTA, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IL-17, IL-18, IL-27, CCL1, CCL2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CSF2, CD40, FAS, STAT4, MIF, EPO, TGF $\beta$ , TNFRSF1A, BAX e AID<sup>52</sup>. As sequências dos genes humanos correspondentes serviram como molde para o desenho de *primers* usados na amplificação e no sequenciamento de DNA genômico de *Saimiri* e *Aotus*. As sequências, então obtidas, foram usadas como moldes para desenhar *primers* específicos para o estudo da expressão gênica por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real quantitativa (PCR-TRq). Posteriormente, células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

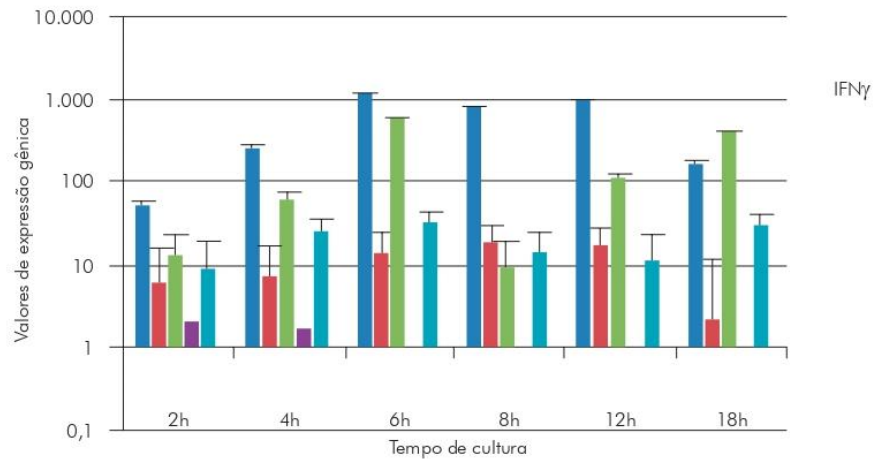
de *Aotus* e *Saimiri* foram purificadas e cultivadas para avaliação de cinética e de expressão gênica sob estimulação mitogênica (entre 2 e 18 h). Foram realizadas a extração de RNA e a síntese de cDNA, que foi usado como molde para as reações de PCR-TRq, utilizando-se os iniciadores baseados nas sequências das duas espécies de macacos. Após a escolha do melhor tempo de expressão (6 h), foi realizado o experimento de infecção em macacos *Saimiri* e a análise da expressão de citocinas em esplenócitos de macacos primo-infectados sob estímulos mitogênico e antigênico. Dos 31 pares de primers desenhados a partir de genes humanos, 17 foram capazes de amplificar e sequenciar o fragmento gênico correspondente em *Saimiri* e *Aotus*. As 17 sequências obtidas foram comparadas com as sequências humanas e de outros primatas não-humanos (Tabela 1). Em alguns casos, graus muito elevados de identidade entre as sequências humana e de *Saimiri* e *Aotus* foram observados (acima de 97%), como TGFβ e BAX, enquanto outras como IL-3 apresentaram baixa identidade (82%). Esses dados mostram que, inicialmente, as sequências humanas podem ser usadas como molde para o desenho de primers empregados na amplificação e sequenciamento de genes de macacos *Saimiri* e *Aotus*. Entretanto, apesar da estreita relação filogenética existente entre *Aotus*, *Saimiri*, outros primatas não-humanos e humanos, as diferenças genômicas existentes são suficientes para restringir ou mesmo impedir o uso de iniciadores baseados em sequências humanas e justificam o esforço de desenvolvimento de ferramentas específicas para os primatas neotropicais. Com base nos dados de sequência obtidos, foram desenhados pares de iniciadores para PCR-TRq para sete das 17 sequências obtidas (IFN-γ, IL-12, TNF, IL-2, IL-6, IL-10 e LTA). Para validar os iniciadores de PCR-TRq e testar o efeito da ativação celular sobre a indução da transcrição desses genes, PBMC de *Saimiri* foram cultivadas em presença ou não de mitógenos (ionomicina/fitohemaglutinina - PMA) durante 2, 4, 6, 8, 12 e 18 h. Os primers detectaram a presença de transcritos em células estimuladas já com 2 h de cultivo celular e que os melhores tempos para detecção de transcritos ocorreram entre 6 e 12 h (Figura 4).

De posse de pares de iniciadores funcionais em PCR-TRq, realizou-se um experimento de infecção de seis *S. sciureus* intactos por formas de estágio sanguíneo de *P. falciparum*. Pôde-se observar que o modelo de infecção de animais não esplenectomizados com a cepa FUP de *P. falciparum* foi viável para indução de parasitemias consistentes, que alcançaram cerca de 10% com nove a 13 dias de infecção (Figura 5A). Os animais apresentaram uma queda brusca de hematócrito, quadro de anemia grave idêntico ao da malária humana (Figura 5B). Para a realização do experimento de infecção, foram usados seis animais intactos, os quais foram esplenectomizados somente sete, 14 ou 28 dias após a infecção. Em todos os casos, foram feitas paralelamente a esplenectomia e a separação de esplenócitos de um animal-controle. As células esplênicas ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram

**Tabela 1** – Grau de identidade encontrado entre os primatas *Aotus* e *Saimiri*, outros primatas não-humanos e o homem

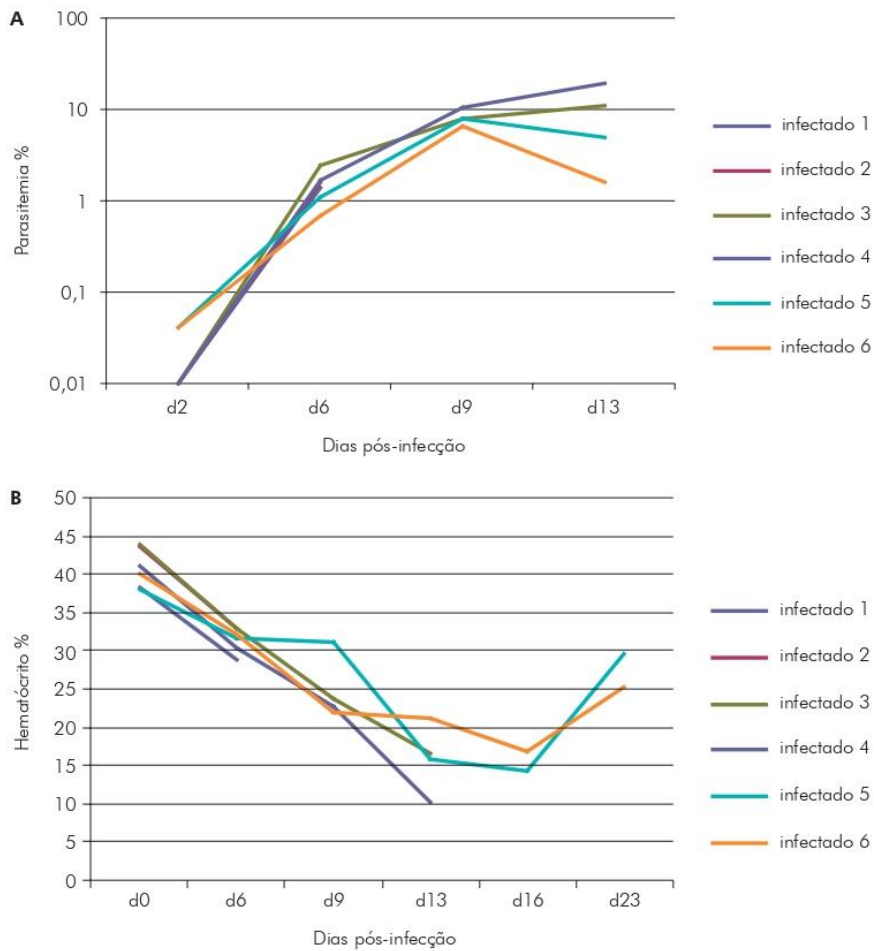
Gene	Grau de identidade de sequência entre espécies		
		<i>A. infulatus</i>	<i>S. sciureus</i>
BAX	Homem	98,0	98,5
CCR5	<i>S. sciureus</i>	NS	98,0
	<i>A. trivirgatus</i>	–	95,5
	Homem	–	94,0
CCR8	Homem	93,1	94,1
CD40	Homem	91,0	91,0
CSF2	Homem	91,1	89,0
IFN-γ	<i>A. lemurinus</i>	99,0	98,0
	<i>A. nancymae</i>	97,2	96,4
	<i>A. nigriceps</i>	99,2	98,4
	<i>A. vociferans</i>	99,0	98,0
	<i>S. sciureus</i>	98,4	99,2
	Homem	92,8	92,0
IL-2	<i>A. lemurinus</i>	99,0	99,4
	<i>A. nancymae</i>	99,0	99,4
	<i>A. nigriceps</i>	99,0	99,4
	<i>A. vociferans</i>	99,0	99,4
	<i>S. sciureus</i>	98,4	99,0
	Homem	93,4	92,0
IL-3	<i>S. sciureus</i>	94,3	–
	<i>M. mullata</i>	86,7	84,3
	<i>P. troglodytes</i>	83,6	82,0
	Homem	84,0	83,0
IL-4	<i>S. sciureus</i>	92,7	–
	<i>M. radiata</i>	93,5	93,5
	<i>P. papio</i>	88,5	88,5
	<i>P. pygmaeus</i>	90,1	90,2
	<i>P. troglodytes</i>	88,5	89,0
	<i>G. gorilla</i>	89,5	90,1
	Homem	90,1	90,2
IL-5	<i>S. sciureus</i>	96,4	NS
	Homem	95,2	–
IL-10	<i>S. sciureus</i>	NS	97,3
	<i>A. lemurinus</i>	–	94,4
	<i>A. nancymae</i>	–	92,1
	<i>A. nigriceps</i>	–	94,4
	<i>A. vociferans</i>	–	94,4
	Homem	–	89,2
IL-12B	<i>P. anubis</i>	90,1	90,1
	<i>C. torquatus</i>	89,3	90,1
	<i>M. mullata</i>	90,1	90,1
	<i>P. troglodytes</i>	88,8	91,0
	Homem	90,6	92,3
IL-13	Homem	95,7	94,3
TGFβ2	Homem	98,0	97,4
TNF	<i>S. sciureus</i>	95,0	99,4
	Homem	92,4	89,2

NS: Não sequenciado. Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.



Os valores no eixo Y representam o aumento relativo da expressão de cada gene em relação ao valor 1 referente ao RNA extraído de PBMCs antes do cultivo celular.

**Figura 4** – Cinética de expressão gênica de IFN $\gamma$ , IL-10, IL-2, IL-12 e TNF em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de *S. sciureus* cultivadas por 2, 4, 6, 8, 12 e 18 h, sob estimulação dos mitógenos ionomicina/fitohemaglutinina



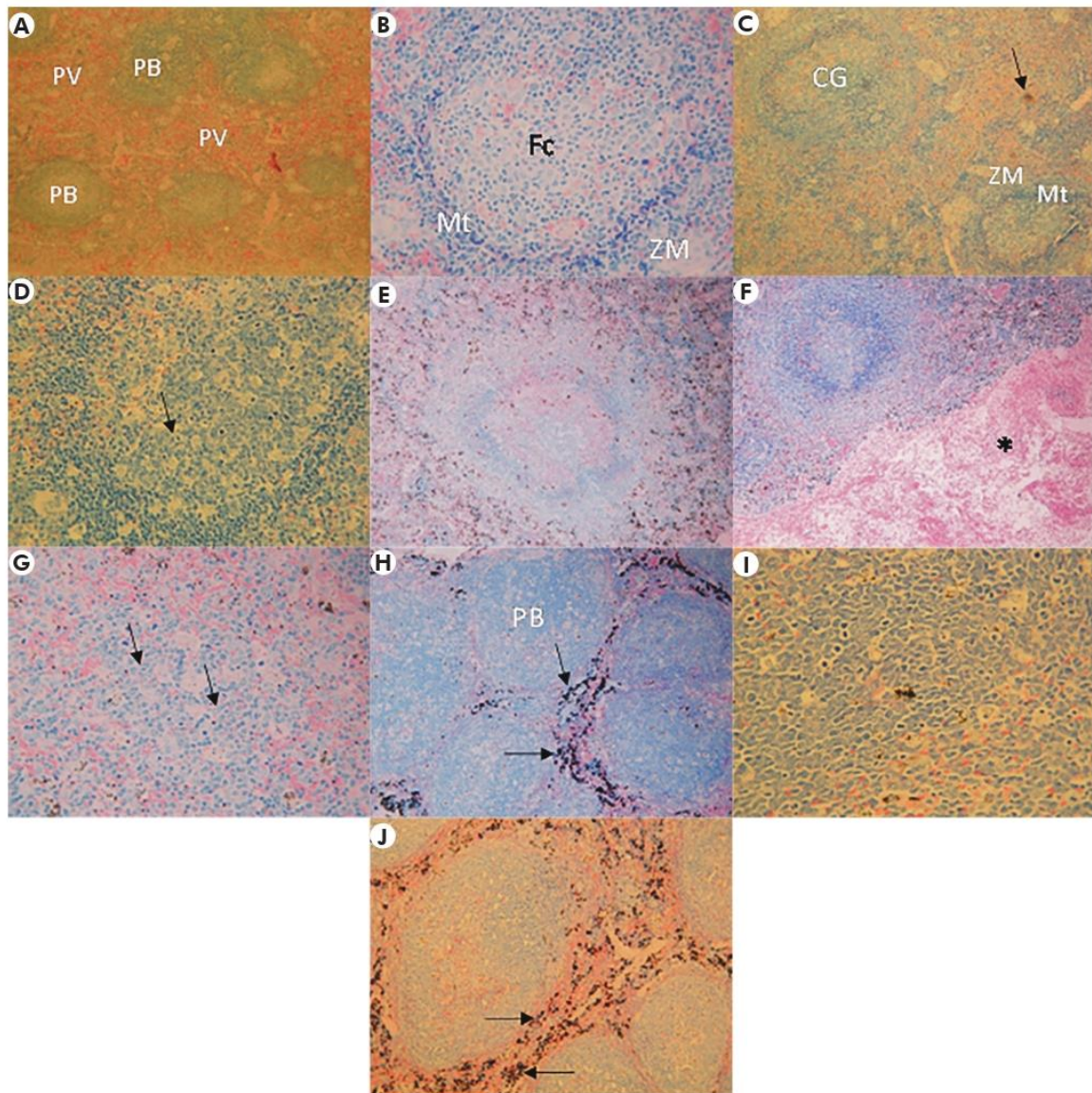
Os animais infectados 1 e 2 foram esplenectomizados com sete dias de infecção, os 3 e 4 foram esplenectomizados com 14 dias de infecção e os infectados 5 e 6 foram esplenectomizados com 28 dias de infecção.

**Figura 5** – Cinética de parasitemia (A) e do hematócrito (B) nos *S. sciureus* não-esplenectomizados após a infecção com  $5 \times 10^7$  hemácias parasitadas/mL pela cepa FUP de *P. falciparum*



cultivadas *in vitro* sob as seguintes condições: i) em presença de hemácias infectadas por *P. falciparum* cultivadas *in vitro*; ii) parasitos livres de *P. falciparum*; iii) antígenos extraídos de *P. falciparum*; e iv) hemácias humanas normais. Após 6 h de cultivo celular, foram

realizadas a extração de RNA, a síntese de cDNA e as reações de PCR-TRq para a detecção de IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12B, LTA e TNF. Os transcritos de beta actina ( $\beta$ -actina) foram usados como controle-interno das reações (controle endógeno).



Fotos: Leonardo José de Moura Carvalho.

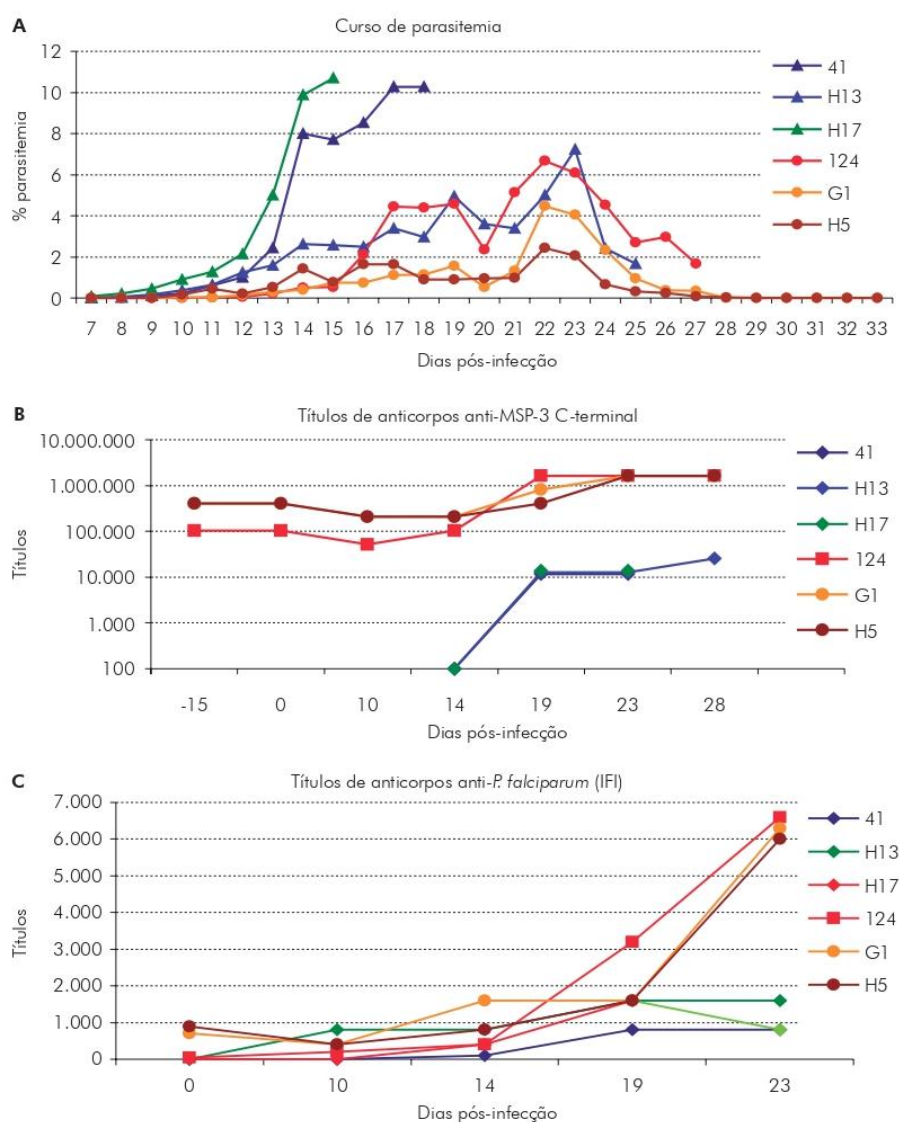
As esplenectomias foram realizadas nos dias sete, 14 ou 28 após a infecção sanguínea. Cortes (5 $\mu$ m) foram realizados, corados com Giemsa e analisados ao microscópio de luz. **A:** Arquitetura esplênica de animal-controle não-infectado mostrando polpa vermelha (PV) e polpa branca (PB) com aspectos normais. **B:** Organização da arquitetura da polpa branca do baço de animal-controle não-infectado mostrando folículo de células B (Fc), zona do manto (Mt) e zona marginal (ZM). **C:** Baço de animal infectado esplenectomizado sete dias após a infecção sanguínea mostrando centro germinal (CG) aumentado de tamanho delimitado por uma zona do manto escura (Mt) e uma delgada zona marginal (ZM). Na polpa vermelha, pode-se observar deposição de grumos de cor marrom, sugestivos de hemozoína (seta). **D:** No dia sete, a polpa branca apresentou intensa ativação celular evidenciada por focos de ocorrência de mitoses dentro do centro germinal (setas). **E:** No dia 14, foi observado aumento do tamanho da polpa branca com evidente perda dos limites com a zona do manto. **F:** No dia 14, foi observada também uma intensa área de congestão de eritrócitos (asterisco). **G:** No dia 14, a zona do manto já não era mais evidenciada na polpa branca, ocorreu um aumento de focos de células em divisão celular com presença de muitos centroblastos (setas), e não se pode mais evidenciar um centro germinativo. **H:** No dia 28, a polpa branca (PB) ocupou quase que a totalidade do estroma esplênico e ocorreu intensa deposição de grumos de coloração marrom na polpa vermelha, sugestivos de hemozoína (setas). **I:** No dia 28, observou-se um princípio de recuperação da arquitetura normal do baço, mas ainda com uma definição imprecisa entre as zonas da polpa branca. **J:** No dia 28, observou-se congestão intensa da polpa esplênica vermelha com extensa acumulação de pigmentos sugestivos de hemozoína (setas).

**Figura 6** – Análise histopatológica do baço de animais *S. sciureus* infectados com  $5 \times 10^7$  hemácias parasitadas pela cepa FUP de *P. falciparum* e do baço de animal-controle não-infectado

A análise de expressão das moléculas em esplenócitos de *Saimiri* infectados evidenciou uma forte reação inflamatória, mediada principalmente por IFN $\gamma$ , com sete dias de infecção, quando já se observava uma desestruturação da arquitetura normal do baço. Com 28 dias, houve uma diminuição da expressão desses genes que coincidiu com uma reestruturação da arquitetura esplênica, que se apresentava ainda com regiões de congestão da microcirculação e importante deposição de hemozoína<sup>51</sup> (Figura 6). Esses dados corroboram os obtidos em humanos, nos quais demonstrou-se que uma forte reação inflamatória durante os estágios iniciais de infecção é seguida por uma inibição tardia dessa resposta, o que corresponde ao padrão de resposta imune importante para o controle do crescimento do parasito e consequente redução das complicações associadas à imunopatogenia<sup>53,54</sup>.

### AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E DA EFICÁCIA VACINAL DAS PROTEÍNAS MSP-3 E GLURP DE *P. FALCIPARUM* NOS PRIMATAS NEOTROPICAIS *S. SCIUREUS* E *A. INFULATUS*

A proteína 3 da superfície de merozoíta (MSP-3) e a proteína rica em glutamato (GLURP) são candidatas a entrar na composição de uma vacina antimalárica, com base em dados experimentais e epidemiológicos sólidos. Essas proteínas são capazes de induzir altos títulos de anticorpos específicos, que estão correlacionados com diversos graus de proteção clínica de indivíduos residentes em áreas endêmicas, proteção contra alta parasitemia e contra a doença. Tais correlações, assim como a capacidade de anticorpos isolados de indivíduos imunes inibirem o crescimento do parasito *in vitro*, também foram observadas na Amazônia brasileira<sup>55</sup>.



**Figura 7** – Curso de parasitemia (A) e títulos de anticorpos anti-MSP-3 C-terminal (ELISA) (B) e anti-parasito (IFI) (C) em macacos *S. sciureus*, imunizados com MSP-3 C-terminal (*Saimiri* 124, G1 e H5) ou controles não imunizados (*Saimiri* 41, H13 e H17), inoculados com 50.000 hemácias parasitadas por *P. falciparum*

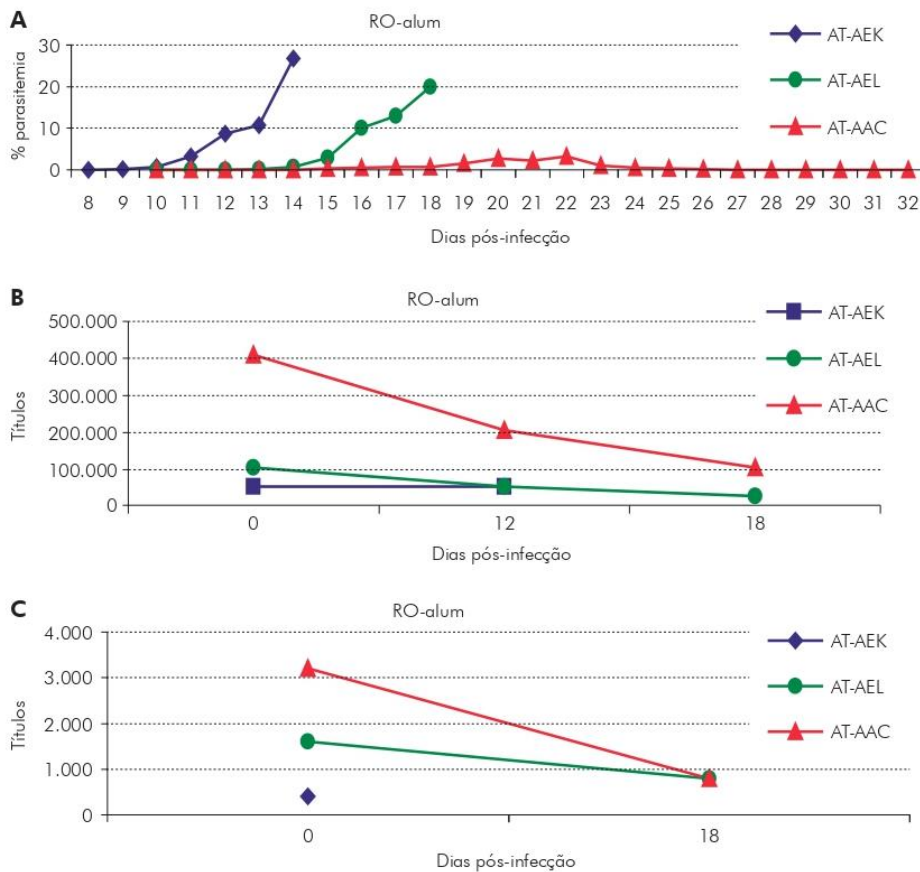
Diante disso, o LabMal se propôs a avaliar a imunogenicidade e a capacidade de indução de imunidade protetora desses antígenos utilizando primatas neotropicais *S. sciureus* e *A. infulatus*. A avaliação consistiu em verificar se os antígenos-teste, em associação com diferentes adjuvantes, eram imunogênicos e capazes de induzir proteção, e estudar o grau de semelhança entre a resposta imune gerada e aquela observada no homem, no que se refere ao reconhecimento dos antígenos e aos mecanismos de proteção envolvidos<sup>56,57</sup>.

Quatro construções derivadas de MSP-3 e uma de GLURP foram avaliadas. As construções derivadas de MSP-3 foram as proteínas recombinantes DG210 e MSP-3 C-terminal e os peptídeos sintéticos MSP-3b e MSP-3 TLP (*très long peptide* – peptídeo muito longo), em combinação com cinco adjuvantes diferentes (ribi, IFA, SBAS2, Montanide ISA 720 e PMC), além de uma construção MSP-3 MAP (*multiple antigen peptide* – antígeno multipéptídico). Com relação à GLURP, uma única combinação consistiu na proteína recombinante RO associada ao adjuvante hidróxido de alumínio (alum).

Os dados mostraram que a imunogenicidade da MSP-3 dependeu tanto da proteína ou do peptídeo utilizado quanto do adjuvante. As formulações MSP-3b-IFA, DG210-IFA, MSP-3 C-terminal-SBAS2 e

MSP-3 C-terminal-Montanide ISA 720 foram testadas em *S. sciureus* e se mostraram imunogênicas; as formulações MSP-3 TLP-SBAS2 e MSP-3 TLP-PMC foram testadas em *S. sciureus* e *A. infulatus* e se mostraram imunogênicas para ambas as espécies. Entretanto, a formulação MSP-3 C-terminal-SBAS2 foi a mais eficaz em induzir imunidade protetora contra o desafio por *P. falciparum* em *S. sciureus*, existindo uma correlação entre a resposta imune dos animais imunizados e a proteção contra a infecção, visto que os soros dos animais protegidos apresentaram títulos mais altos de anticorpos contra o parasito do que os não protegidos (Figura 7).

A formulação RO-alum foi testada em *S. sciureus* e *A. infulatus* e se mostrou imunogênica em ambas as espécies, sendo capaz de induzir imunidade protetora contra o desafio em um *Saimiri* que apresentou título elevado de anticorpos contra o parasito<sup>52</sup>. A proteção foi correlacionada com a resposta imune apresentada por esse *Saimiri* em comparação com os *Saimiri* não protegidos. Esse animal protegido apresentou baixas parasitemias e altos títulos de anticorpos contra RO e contra o parasito (Figura 8). Além disso, a proteção estava relacionada com o amplo reconhecimento da proteína nativa e com o amplo perfil de reconhecimento epitópico da proteína imunizante.

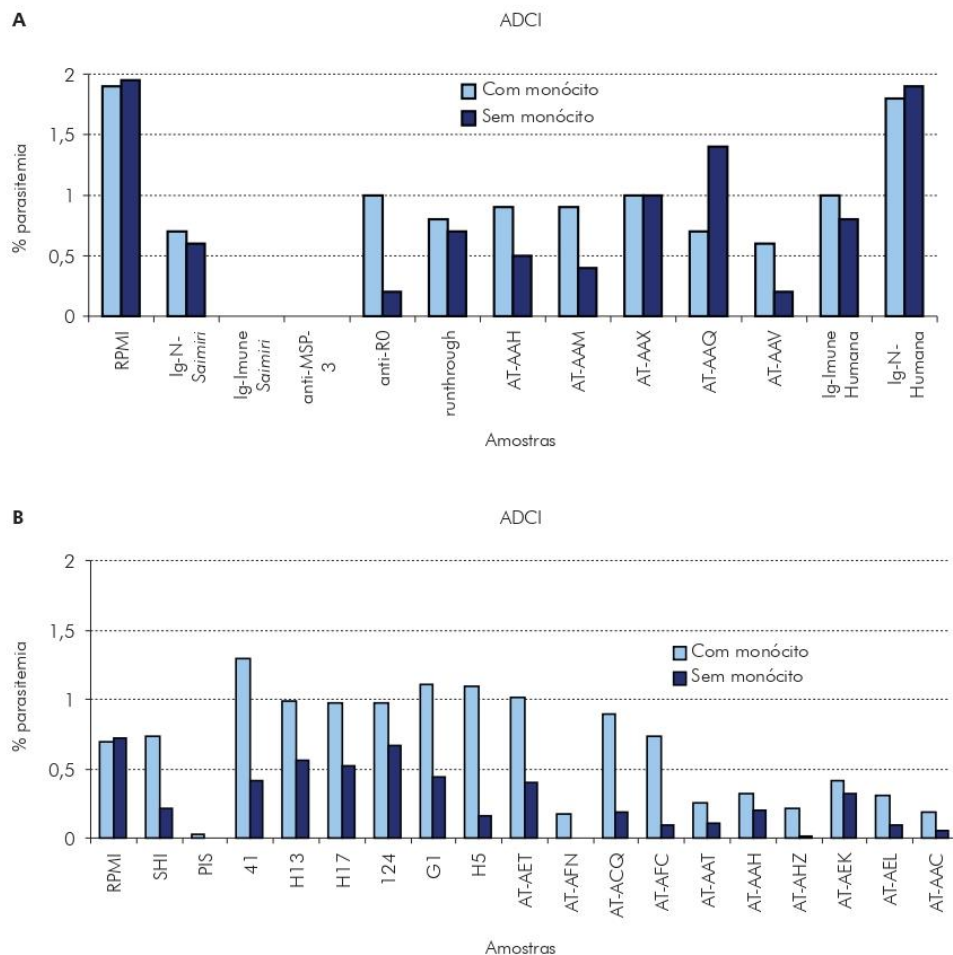


**Figura 8** – Curso de parasitemia (A) e títulos de anticorpos anti-RO (B) e anti-parasito (C) em *S. sciureus* protegido (AT-AAC) e não-protegidos (AT-AEK e AT-AEL) imunizados com RO-alum e inoculados com 5.000 hemácias parasitadas por *P. falciparum*

Foram realizados experimentos de inibição celular dependente de anticorpo (ADCI), com soros de animais imunizados, soros imunes (pools e soros individuais), imunoglobulinas (Ig) purificadas a partir de um pool de soros imunes (PIS) e de um pool de soros normais (SNS), e anticorpos anti-MSP-3b e anti-RO purificados a partir da Ig imune<sup>53</sup>. Os dados mostraram que soros e anticorpos anti-MSP-3 purificados de *Saimiri* imunes possuem um forte poder inibidor do crescimento do parasito, sendo capazes de eliminá-lo na presença ou não de monócitos. Entre os animais imunizados, não houve correlação entre proteção e capacidade de inibição do crescimento do parasito *in vitro* (Figura 9). Em conjunto, esses dados mostraram que o mecanismo de ação inibitória do crescimento *in vitro* de *P. falciparum* dos anticorpos anti-MSP-3 e anti-RO de *S. sciureus* pode não envolver necessariamente

cooperação com monócitos, ao contrário do mecanismo de ADCI descrito na resposta imune em humanos imunes<sup>54,55</sup>. Não está excluído, entretanto, que tal mecanismo também opere no modelo simiano.

Considerando que, de todas as formulações testadas, as que se apresentaram mais imunogênicas e capazes de induzir proteção parcial em *Saimiri* foram a proteína recombinante MSP-3 C-terminal em associação com o adjuvante AS02 e a região RO da GLURP em associação com o alume, o LabMal avaliou a imunogenicidade e a eficácia de uma proteína recombinante híbrida GLURP/MSP-3<sup>52</sup>. Essa proteína híbrida, que contém as regiões C-terminal da MSP-3 e RO da GLURP, foi expressa em *Lactococcus lactis* e formulada com três diferentes adjuvantes, alum, Montanide ISA 720 e Freund.

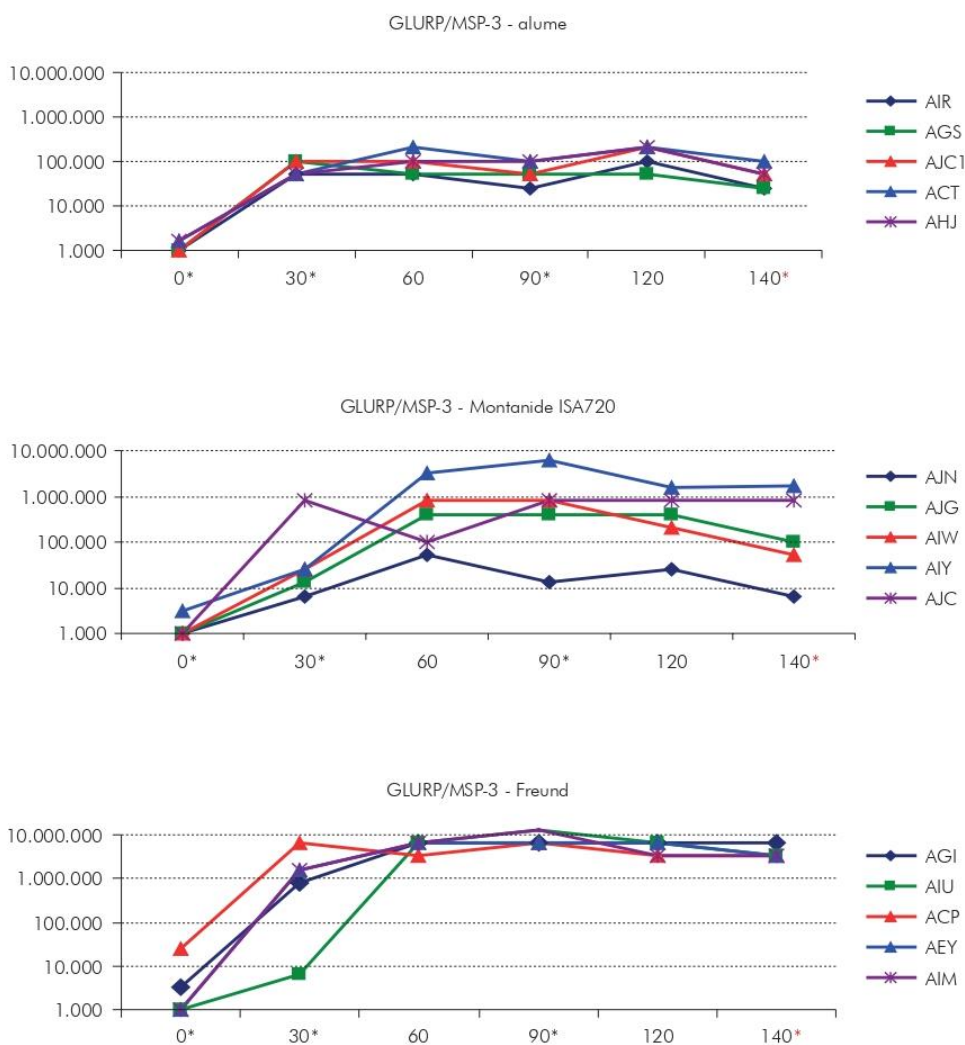


**A:** AT-AAH: *S. sciureus* imunizado com RO-alum (pré-desafio); AT-AAM até AT-AAV: *S. sciureus* imunizados com DG210-IFA (pré-desafio); **B:** PIS e SHI: soros imunes de *S. sciureus*; 41, H13 e H17: soros de *S. sciureus* não imunizados; 124, G1, H5, AT-AET e AT-AFN: soros de *S. sciureus* imunizados com MSP-3 C-terminal-SBAS2 (pré-desafio); AT-ACQ e AT-AFC: soros de *S. sciureus* imunizados com DG210-IFA (pré-desafio); AT-AAT, AT-AAH, AT-AHZ, AT-AEK, AT-AEL e AT-AAC: soros de *S. sciureus* imunizados com RO-alum.

**Figura 9** – Efeito de soros ou imunoglobulinas de macacos *S. sciureus* tornados imunes por repetidas infecções por *P. falciparum* ou imunizados com MSP-3 ou GLURP sobre o crescimento *in vitro* de *P. falciparum*, na presença de monócitos (ensaio de ADCI) ou não

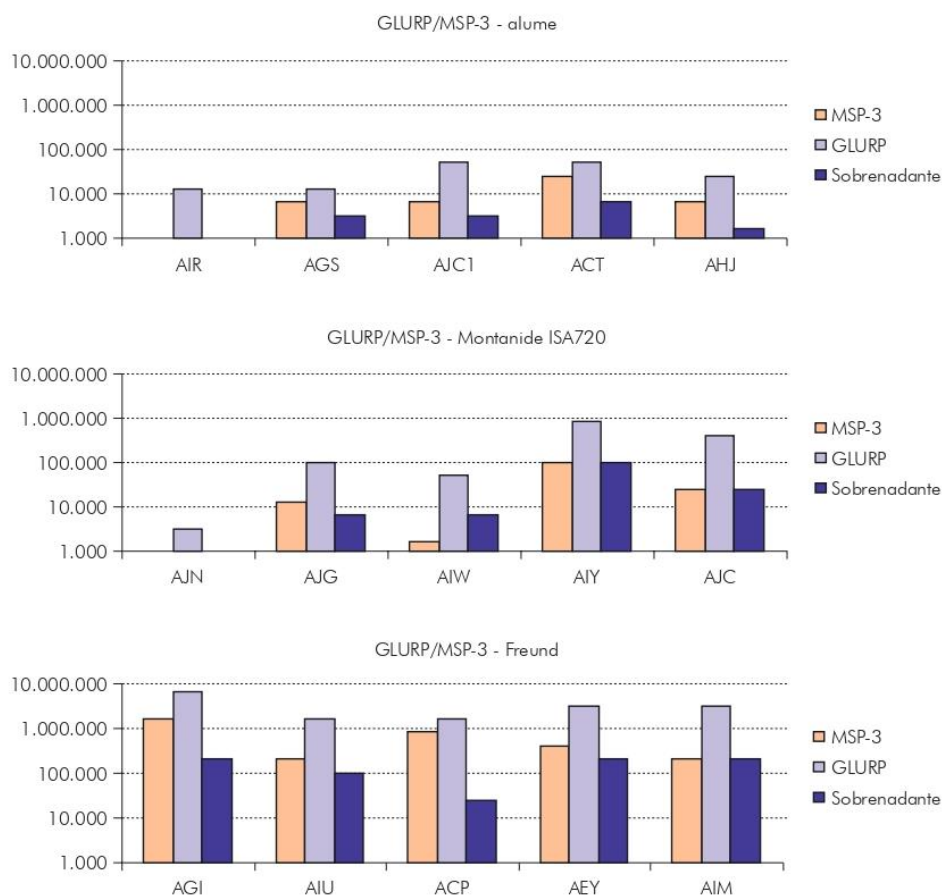
Vinte macacos *Saimiri* foram imunizados com as diferentes formulações e desafiados com 50.000 Pfhp. Os dados mostraram que as três formulações testadas foram imunogênicas e que, na maioria dos casos, duas doses eram suficientes para eliciar altos níveis de anticorpos. A formulação GLURP/MSP-3-Freund induziu títulos mais altos de anticorpos, enquanto a formulação GLURP/MSP-3-alum induziu os títulos mais baixos de anticorpos. Com a formulação GLURP/MSP-3-Montanide ISA 720, os títulos de anticorpos variaram (Figura 10), com dois animais apresentando altos títulos de anticorpos e três apresentando baixos títulos de anticorpos. Títulos de anticorpos foram maiores para a proteína GLURP que para MSP-3 (Figura 11), e, de uma maneira geral, os títulos de anticorpos para as proteínas individuais foram mais baixos do que os títulos de anticorpos para a proteína híbrida GLURP/MSP-3.

Após o desafio, os cinco *Saimiri* imunizados com GLURP/MSP-3-alum apresentaram um rápido aumento na parasitemia. Os dois *Saimiri* imunizados com GLURP/MSP-3-Montanide ISA 720 que apresentaram altos títulos de anticorpos tiveram um retardo no aparecimento da parasitemia. No grupo de animais imunizados com GLURP/MSP-3-Freund, a parasitemia permaneceu baixa em um dos cinco animais e outros três desenvolveram uma parasitemia relativamente alta, mas foram capazes de mantê-la abaixo de 10% por vários dias (Figura 12). Quando os animais foram reagrupados de acordo com o resultado obtido nos experimentos de desafio (nenhuma proteção versus proteção parcial ou proteção total), foi observada uma associação estatisticamente significativa entre altos títulos de anticorpos e proteção. Em conjunto, os dados mostraram que GLURP e MSP-3 são capazes de induzir proteção contra a infecção<sup>45,52,53</sup>.



\* Imunizações; \* Desafio.

**Figura 10** – Evolução dos títulos de anticorpos anti-GLURP/MSP-3 híbrida (em ELISA) em *S. sciureus* imunizados com a proteína híbrida



**Figura 11** – Títulos de anticorpos anti-MSP-3 C-terminal, anti-GLURP/R0 e anti-sobrenadante de cultura de *Lactococcus* (controle) em *S. sciureus* imunizados com a proteína híbrida GLURP/MSP-3

## CONCLUSÃO

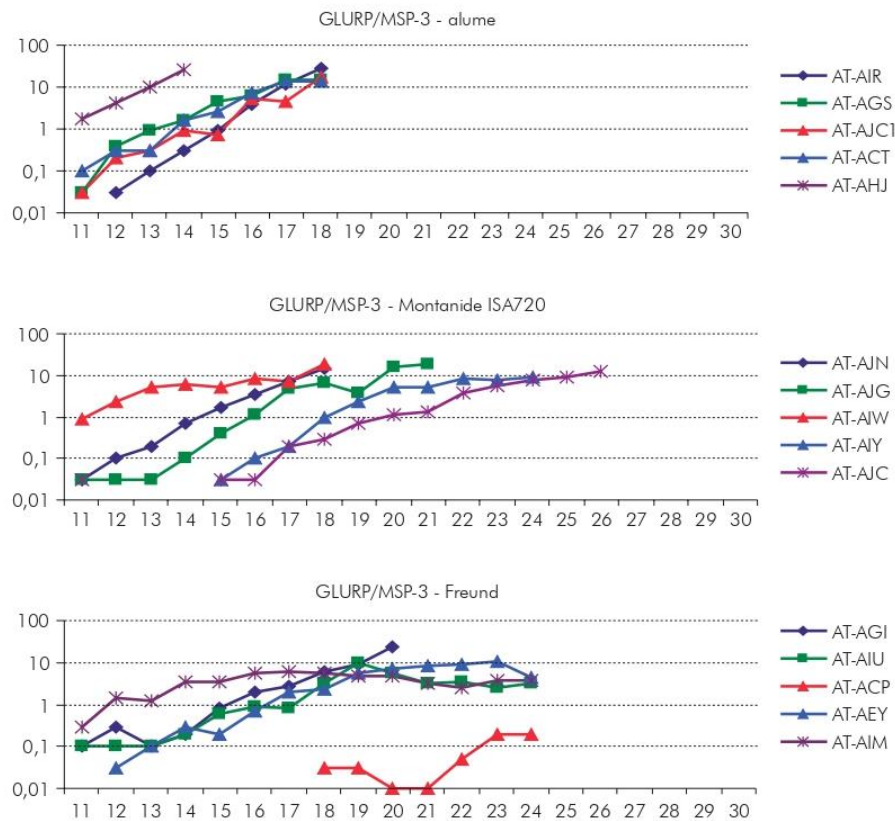
Em suma, os dados relacionados no presente trabalho, frutos da parceria entre o LabMal e o CENP, mostraram que os primatas neotropicais *A. infulatus*, esplenectomizados ou não, são susceptíveis à infecção experimental por *P. falciparum*, representando um modelo experimental indicado para ensaios vacinais de antígenos plasmodiais. Adicionalmente, os *A. infulatus* são susceptíveis ao desenvolvimento de anemia grave, tornando-os bons modelos de estudos experimentais em malária humana, também no que diz respeito à patogênese de anemia grave.

Apesar de, inicialmente, as seqüências humanas servirem como molde para o desenho de iniciadores empregados na amplificação e sequenciamento de genes de macacos *Saimiri* e *Aotus*, as diferenças genômicas existentes entre humanos, *Saimiri* e *Aotus* são suficientes para coibir ou inibir o uso de iniciadores baseados em seqüências humanas, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de ferramentas específicas para primatas neotropicais. O desenvolvimento de uma PCR em tempo real, utilizando iniciadores específicos para primatas neotropicais, permitiu a análise de várias citocinas alteradas durante a infecção por malária, e essa técnica é considerada a melhor ferramenta para avaliação da resposta imune celular em *S. sciureus*.

A imunização de primatas *Saimiri* e *Aotus* com quatro construções derivadas da proteína MSP-3 e uma da proteína GLURP com diferentes adjuvantes (Ribi, IFA, SBAS2, Montanide ISA 720 e PMC) mostrou que as formulações MSP-3 C-terminal-SBAS2 e R0-alum foram imunogênicas e capazes de induzir imunidade protetora contra o desafio por *P. falciparum*. A imunização induziu a produção de anticorpos capazes não apenas de inibir o crescimento, mas de eliminar os parasitos, na presença ou não de monócitos.

Finalmente, a imunização de macacos *Saimiri* com uma proteína recombinante híbrida contendo as regiões C-terminal da MSP-3 e R0 da GLURP expressa em *Lactococcus lactis* e formulada com três diferentes adjuvantes (alum, Montanide ISA 720 e Freund) mostrou que as três formulações são imunogênicas e capazes de induzir a formação de anticorpos protetores.

Em conjunto, os dados obtidos no LabMal, em uma colaboração de cerca de 25 anos com o CENP/IEC, mostram que os antígenos GLURP e MSP-3 são capazes de induzir proteção contra a infecção plasmodial e que os modelos *A. infulatus*/*P. falciparum* e *S. sciureus*/*P. falciparum* são boas alternativas para ensaios vacinais de antígenos plasmodiais.



**Figura 12** – Curso de parasitemia em *S. sciureus* imunizados com GLURP/MSP-3 híbrida e com sobrenadante de cultura de *Lactococcus* (controle) e inoculados com 50.000 hemácias parasitadas por *P. falciparum*

Entretanto, apesar de serem os melhores modelos para a avaliação de vacinas antimaláricas, existem pontos a serem melhorados na sua utilização.

### CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

### CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram com a idealização do estudo, a análise e a interpretação dos dados e com a redação do manuscrito, aprovando a versão final publicada. Declaram-se responsáveis pelo conteúdo integral do artigo, garantindo sua precisão e integridade.



### REFERÊNCIAS

- 1 Menkin-Smith L, Winders WT. *Plasmodium vivax* malaria. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Aug 11.
- 2 World Health Organization. World malaria report 2019 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2019 [cited 2021 May 20]. Available from: [https://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report/en/](https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/).
- 3 Rajahram GS, Cooper DJ, William T, Grigg MJ, Anstey NM, Barber BE. Deaths from *Plasmodium knowlesi* malaria: case series and systematic review. *Clin Infect Dis*. 2019 Oct;69(10):1703-11.
- 4 Rajahram GS, Barber BE, William T, Grigg MJ, Menon J, Yeo TW, et al. Falling *Plasmodium knowlesi* malaria death rate among adults despite rising incidence, Sabah, Malaysia, 2010–2014. *Emerg Infect Dis*. 2016 Jan;22(1):41-8.
- 5 Rajahram GS, Barber BE, Yeo TW, Tan WW, William T. Case report: fatal *Plasmodium knowlesi* malaria following an atypical clinical presentation and delayed diagnosis. *Med J Malaysia*. 2013;68(1):71-2.
- 6 Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, et al. Severe malaria – a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J*. 2010 Jan;9:10.

- 7 Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Bianco Jr C, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*. 2017 Oct;5(10):e1038-e1046.
- 8 Chrubasik C, Jacobson RL. The development of artemisinin resistance in malaria: reasons and solutions. *Phytother Res*. 2010 Jul;24(7):1104-6.
- 9 Saralamba S, Pan-Ngum W, Maude RJ, Lee SJ, Tarning J, Lindegardh N, et al. Intrahost modeling of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Jan;108(1):397-402.
- 10 Pribluda VS, Evans L 3rd, Barillas E, Marmion J, Lukulay P, Chang J. Were medicine quality and pharmaceutical management contributing factors in diminishing artemisinin efficacy in Guyana and Suriname? *Malar J*. 2014 Mar;13:77.
- 11 World Health Organization. World malaria report 2014 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014 [cited 2021 May 20]. Available from: [https://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/).
- 12 Ricotta E, Kwan J. Artemisinin-resistant malaria as a global catastrophic biological threat. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2019;424:33-57.
- 13 Müller O, Lu G, Jahn A, Mockenhaupt FP. How worthwhile is methylene blue as a treatment of malaria? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019 Jul;17(7):471-3.
- 14 World Health Organization. Global technical strategy for malaria 2016–2030 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 2021 May 20]. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176712/9789241564991\\_eng.pdf;jsessionid=C7A3A7005E18CF147069B6DFBAB77B4E?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/176712/9789241564991_eng.pdf;jsessionid=C7A3A7005E18CF147069B6DFBAB77B4E?sequence=1).
- 15 Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*. 2009 May 26;11:e16.
- 16 Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, et al. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1(Suppl 1):91-104.
- 17 Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol*. 2002 Oct;56(4):327-43.
- 18 Reed ZH, Friede M, Kieny MP. Malaria vaccine development: progress and challenges. *Curr Mol Med*. 2006 Mar;6(2):231-45.
- 19 Vaughan AM, Kappe SH. Malaria vaccine development: persistent challenges. *Curr Opin Immunol*. 2012 Jun;24(3):324-31.
- 20 Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J*. 2012 Jan;11:11.
- 21 Keating C. The history of the RTS,S/AS01 malaria vaccine trial. *Lancet*. 2020 Apr;395(10233):1336-7.
- 22 Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum Vaccin Immunother*. 2020 Mar;16(3):480-9.
- 23 Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, Cohen JC, Schneider I, LaChance R, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis*. 1995 Jun;171(6):1576-85.
- 24 Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M, Vekemans J, et al. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med*. 2008 Dec;359(24):2521-32.
- 25 Abdulla S, Oberholzer R, Juma O, Kubhoja S, Machera F, Membi C, et al. Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants. *N Engl J Med*. 2008 Dec;359(24):2533-44.
- 26 Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, et al. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med*. 2011 Nov;365(20):1863-75.
- 27 Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, Abossolo BP, Methogo BGNO, Kabwende AL, et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med*. 2012 Dec;367(24):2284-95.
- 28 The RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med*. 2014 Jul;11(7):e1001685.
- 29 White MT, Verity R, Griffin JT, Asante KP, Owusu-Agyei S, Greenwood B, et al. Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2015 Dec;15(12):1450-8.
- 30 Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW, et al. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog*. 2012 Feb;8(2):e1002401.



- 31 Beignon AS, Le Grand R, Chapon C. *In vivo* imaging in NHP models of malaria: challenges, progress and outlooks. *Parasitol Int.* 2014 Feb;63(1):206-15.
- 32 Lombardini ED, Gettayacamin M, Turner GDH, Brown AE. A review of *Plasmodium coatneyi*-Macaque models of severe malaria. *Vet Pathol.* 2015 Nov;52(6):998-1011.
- 33 Martinelli A, Culleton R. Non-human primate malaria parasites: out of the forest and into the laboratory. *Parasitology.* 2018 Jan;145(1):41-54.
- 34 Riccio EKP, Pratt-Riccio LR, Bianco-Jr C, Sanchez V, Totino PRR, Carvalho LJM, et al. Molecular and immunological tools for the evaluation of the cellular immune response in the neotropical monkey *Saimiri sciureus*, a non-human primate model for malaria research. *Malar J.* 2015 Apr;14:166.
- 35 Kennedy RC, Shearer MH, Hildebrand W. Nonhuman primate models to evaluate vaccine safety and immunogenicity. *Vaccine.* 1997 Jun;15(8):903-8.
- 36 World Health Organization. Role of non-human primates in malaria vaccine development: memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO.* 1988;66(6):719-28.
- 37 Reynolds J. Report on the Biomedical Primate Research Centre. Annual resource guide 1999-2000. Primate supply information clearinghouse. Washington: Regional Primate Research Center; 2001.
- 38 Bailey J. Non-human primates in medical research and drug development: a critical review. *Biol Am J.* 2005;19(4):235-55.
- 39 Collins WE. South American monkeys in the development and testing of malarial vaccines – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87 Suppl 3:401-6.
- 40 Criswell BS, Butler WT, Rossen RD, Knight V. Murine malaria: the role of humoral factors and macrophages in destruction of parasitized erythrocytes. *J Immunol.* 1971 Jul;107(1):212-21.
- 41 Achtman AH, Khan M, MacLennan ICM, Langhome J. *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. *J Immunol.* 2003 Jul;171(1):317-24.
- 42 Leisewitz AL, Rockett KA, Gumede B, Jones M, Urban B, Kwiatkowski DP. Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection. *Infect Immun.* 2004 Jul;72(7):4233-9.
- 43 Hershkovitz P. Two new species of night monkeys, genus *Aotus* (Cebidae, platyrrhini): a preliminary report on *Aotus* taxonomy. *Am J Primatol.* 1983;4(3):209-43.
- 44 Collins WE, Galland GG, Sullivan JS, Morris CL, Richardson BB. The Santa Lucia strain of *Plasmodium falciparum* as a model for vaccine studies. II. Development of *Aotus vociferans* as a model for testing transmission-blocking vaccines. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Apr;54(4):380-5.
- 45 Carvalho LJM, Oliveira SG, Alves FA, Brígido MCO, Muniz JAPC, Daniel-Ribeiro CT. *Aotus infulatus* monkey is susceptible to *Plasmodium falciparum* infection and may constitute an alternative experimental model for malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 May-Jun;95(3):363-5.
- 46 Carvalho LJM, Alves FA, Oliveira SG, Rio do Valle RD, Fernandes AAM, Muniz JAPC, et al. Severe anemia affects both splenectomized and non-splenectomized *Plasmodium falciparum*-infected *Aotus infulatus* monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Jul;98(5):679-86.
- 47 Kakoma I, James MA, Whiteley HE, Montelegre F, Buese M, Fafjar-Whestone CJ, et al. Platelet kinetics and other hematological profiles in experimental *Plasmodium falciparum* infection: a comparative study between *Saimiri* and *Aotus* monkeys. *Korean J Parasitol.* 1992 Sep;30(3):177-82.
- 48 Jones TR, Stroncek DF, Gozalo AS, Obaldia 3rd N, Andersen EM, Lucas C, et al. Anemia in parasite- and recombinant protein-immunized *Aotus* monkeys infected with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jun;66(6):672-9.
- 49 Egan AF, Fabucci ME, Saul A, Kaslow DC, Miller LH. *Aotus* New World monkeys: model for studying malaria-induced anemia. *Blood.* 2002 May;99(10):3863-6.
- 50 Alves FA. Estudo da suscetibilidade e da vulnerabilidade do primata neotropical *Aotus infulatus* à infecção pelo *Plasmodium falciparum* e sua utilização na avaliação pré-clínica de dois antígenos candidatos à vacina antimalárica [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2003.
- 51 Alves FA. Desenvolvimento e validação de ferramentas moleculares para análise da resposta imune de primatas *Aotus* e *Saimiri* [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009.
- 52 Alves FA, Souza MT, Gonçalves EC, Schneider MPC, Marinho AM, Muniz JAPC, et al. DNA sequencing of 13 cytokine gene fragments of *Aotus infulatus* and *Saimiri sciureus*, two non-human primate models for malaria. *Cytokine.* 2010 Dec;52(3):151-5.
- 53 Hensmann M, Kwiatkowski D. Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2001 Apr;69(4):2364-71.

- 54 Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- $\gamma$  from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* 2002 Sep;169(6):2956-63.
- 55 Pratt-Riccio LR, Bianco-Jr C, Totino PRR, Perce-Da-Silva DD, 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 Aug;106 Suppl 1:34-43.
- 56 Carvalho LJM, Alves FA, Bianco Jr C, Oliveira SG, Zanini GM, Soe S, et al. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Feb;12(2):242-8.
- 57 Carvalho LJM, Oliveira SG, Theisen M, Alves FA, Andrade MCR, Zanini GM, et al. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 and glutamate-rich protein suggests that protection is related to antibody levels. *Scand J Immunol.* 2004 Apr;59(4):363-72.
- 58 Oeuvray C, 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 *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood.* 1994 Sep;84(5):1594-602.
- 59 Theisen M, Soe S, Jessing SG, Okkels LM, Danielsen S, Oeuvray C, et al. Identification of a major B-cell epitope of the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing. *Vaccine.* 2000 Sep;19(2-3):204-12.

Como citar este artigo / How to cite this article:

Pratt-Riccio LR, Riccio EKP, Bianco-Junior C, Alves FA, Baptista BO, Totino PRR, et al. Uso de modelos de primatas neotropicais para pesquisa em malária: um histórico dos 25 anos de colaboração entre o Laboratório de Pesquisa em Malária (IOC, Fiocruz) e o Centro Nacional de Primatas (IEC, SVS). *Rev Pan Amaz Saude.* 2021;12 num esp:e202100462. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-6223202100462>



### Anexo XIII – Coautoria em artigo

***Plasmodium vivax* metacaspase 1 (PvMCA1) catalytic domain is conserved in field isolates from Brazilian Amazon.**

Hugo Amorim dos Santos de Souza, Victor Fernandes Escafa, Carolina Moreira Blanco, **Barbara de Oliveira Baptista**, Jenifer Peixoto de Barros, Evelyn Ketty Pratt Riccio, Aline Beatriz Mello Rodrigues, Gisely Cardoso de Melo, Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, Rodrigo Medeiros de Souza, Josué da Costa Lima-Junior, Ana Carolina Ramos Guimarães, Fabio Faria da Mota, João Hermínio Martins da Silva, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, Lilian Rose Pratt-Riccio, Paulo Renato Rivas Totino.

## *Plasmodium vivax* metacaspase 1 (PvMCA1) catalytic domain is conserved in field isolates from Brazilian Amazon

Hugo Amorim dos Santos de Souza<sup>1</sup>, Victor Fernandes Escafa<sup>1</sup>, Carolina Moreira Blanco<sup>1</sup>, Bárbara de Oliveira Baptista<sup>1</sup>, Jenifer Peixoto de Barros<sup>1</sup>, Evelyn Ketty Pratt Riccio<sup>1</sup>, Aline Beatriz Mello Rodrigues<sup>2</sup>, Gisely Cardoso de Melo<sup>3,4</sup>, Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda<sup>4,5</sup>, Rodrigo Medeiros de Souza<sup>6</sup>, Josué da Costa Lima-Junior<sup>7</sup>, Ana Carolina Ramos Guimarães<sup>2</sup>, Fabio Faria da Mota<sup>8</sup>, João Hermínio Martins da Silva<sup>9</sup>, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro<sup>1</sup>, Lilian Rose Pratt-Riccio<sup>1</sup>, Paulo Renato Rivas Totino<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Malária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

<sup>4</sup>Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Manaus, AM, Brasil

<sup>5</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Leônidas and Maria Deane, Manaus, AM, Brasil

<sup>6</sup>Universidade Federal do Acre, Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro Multidisciplinar, Rio Branco, AC, Brasil

<sup>7</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunoparasitologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>8</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>9</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Eusébio, CE, Brasil

In the present study, we investigated the genetic diversity of *Plasmodium vivax* metacaspase 1 (PvMCA1) catalytic domain in two municipalities of the main malaria hotspot in Brazil, i.e., the Juruá Valley, and observed complete sequence identity among all *P. vivax* field isolates and the Sal-1 reference strain. Analysis of PvMCA1 catalytic domain in different *P. vivax* genomic sequences publicly available also revealed a high degree of conservation worldwide, with very few amino acid substitutions that were not related to putative histidine and cysteine catalytic residues, whose involvement with the active site of protease was herein predicted by molecular modeling. The genetic conservation presented by PvMCA1 may contribute to its eligibility as a druggable target candidate in vivax malaria.

Key words: *P. vivax* - metacaspase - genetic diversity

The emergence and spread of drug-resistant parasites constitute major obstacles to malaria control in the world,<sup>(1)</sup> where *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* are the most important species causing malaria.<sup>(2)</sup> Throughout the history of antimalarial therapy, *P. falciparum* has been notorious for its capacity to develop resistance to diverse antimalarial drugs, including chloroquine, sulfadoxine/pyrimethamine and, more recently, artemisinin in Southeast Asia.<sup>(1,3)</sup> Nevertheless, emergence of drug-resistant *P. vivax* has also been documented since the late 1980s in Papua New Guinea and,<sup>(4,5)</sup> currently, therapeutic failure of chloroquine, which combined with primaquine comprise the first-line treatment for vivax malaria, is reported in many vivax-endemic countries,<sup>(6,7)</sup> while the magnitude of primaquine tolerance remains largely unknown.<sup>(8)</sup> These facts highlight the urgent need

for the development of novel compounds targeting plasmodial molecular pathways with mechanisms of action different from the classical antimalarial drugs.

In this scenario, proteases playing significant roles in parasite survival have been for long time considered molecular targets for antimalarial drug development and,<sup>(9,10)</sup> more recently, members of metacaspase family, whose activity was already suggested to be implicated in both growth and cell death of *Plasmodium* and other protozoan parasites, have emerged as novel candidates.<sup>(11,12)</sup> Metacaspases are cysteine proteases belonging to the C14 family that are found in genome of protists, fungi, algae and plants. They present structural similarity to metazoan caspases, both having a conserved His-Cys catalytic dyad in the large (p20) domain, but different substrate specificity.<sup>(13)</sup> In *Plasmodium* genomes, three metacaspases (MCA1-3) occur<sup>(14)</sup> and a study performed with field isolates from Mauritania, Sudan and Oman showed that *P. vivax* metacaspase 1 (PvMCA1) can present single nucleotide polymorphisms in the putative His-Cys catalytic residues,<sup>(15)</sup> which in some extent can be a factor limiting the eligibility of PvMCA1 as a novel drug target for vivax malaria. In the present study, therefore, we investigated the genetic diversity of the PvMCA1 catalytic domain in a *P. vivax* population from the main malaria hotspot in Brazil - a country where this plasmodial species is highly prevalent (~90%).<sup>(2,16)</sup>

doi: 10.1590/0074-0276200584

Financial support: IOC (FIOCRUZ), FAPERJ, CAPES.

MVGL and CTDR receive a Productivity Research Fellowship from the CNPq, Brazil; CTDR is a "Cientista do Nosso Estado" from FAPERJ.

+ Corresponding author: prtoto@ioc.fiocruz.br

✉ <https://orcid.org/0000-0002-4790-3317>

Received 13 November 2020

Accepted 04 May 2021



**Study area and sample collection** - *P. vivax* parasite isolates were collected from two municipalities [Cruzeiro do Sul (CZS; 7°37'51"S, 72°40'12"W) and Mâncio Lima (ML; 07°36'50"S, 72°53'4"W)] situated in the Juruá Valley, Northwest of the Acre State, Brazilian Amazon, from June to August 2016 and 2018. Covering together a surface area of 12,597 km<sup>2</sup> (CZS: 7,925 km<sup>2</sup>; ML: 4,672 km<sup>2</sup>), these municipalities are among the endemic areas with the highest annual parasite incidence (API) (positive blood slides per 1,000 inhabitants) in Brazil, presenting an epidemiological profile with sustained high transmission over the last decade. For reference, the Brazilian Ministry of Health considers high risk areas those with API ≥ 50, and Mâncio Lima and Cruzeiro do Sul registered APIs of 436.4 and 231.9 in 2016 and 422.8 and 147.5 in 2018, respectively. In these areas, eighty-three *P. vivax* mono-infected individuals living in different localities and presenting uncomplicated malaria were diagnosed through microscopic examination of Giemsa-stained thick blood smears and, then, a single blood sample was collected in EDTA tubes from each individual before initiation of treatment. Samples were centrifuged at 350 g for 10 min to remove plasma and cell pellet was preserved at -20°C in glycerolyte solution (1:2). Written informed consent was obtained from all donors and the study was reviewed and approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee and the National Ethical Committee of Brazil (CEP-FIOCRUZ CAAE 46084015.1.0000.5248). All *P. vivax* infections were later confirmed by polymerase chain reaction (PCR) assay, as previously described.<sup>(17)</sup>

**DNA extraction and PCR amplification** - parasite DNA was extracted from cryopreserved blood samples by QIAamp DNA blood midi kit (QIAGEN), following the manufacturer's instructions, and stored at -20°C until use. Gene segment coding for the catalytic domain of PvMCA1 was amplified by standard PCR method using a pair of specific primers (forward, 5'-CATGGAAACAAAAAAGG-3'; reverse, 5'-CGAAACTCCATATCTTTGC-3'), as previously described.<sup>(15)</sup> PCR was performed in a Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) with a total volume of 25 µL reaction mixture containing 3 µL genomic DNA, 10 pmol/µL each primer, 2.5 unit AmpliTaq™ Gold DNA polymerase, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 µL of 10X PCR buffer. The following conditions were used: 35 cycles at 95°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 2 min. Amplified products were size-fractionated by electrophoresis within 2% agarose gel (Sigma) containing 0.5 µg/mL of ethidium bromide and, then, were visualised by ultraviolet illumination.

**Sequencing and polymorphism analysis** - PCR products were purified by Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) following the manufacturer's instructions and sequenced in both directions using above-mentioned primers. The sequencing reaction was performed in duplicate according BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems™ using 75-100 ng of the purified PCR products and, then, the obtained products were read on a 3730 xl DNA Analyser (Applied Biosystems). Forward and reverse sequences

were compared and checked for quality by using SeqMan v.7.0.0 of the DNASTAR software package (Lasergen, Madison, WI, USA), with default parameters, following manual inspection of chromatograms to eliminate ambiguous bases. A minimum quality score of 20 (base call accuracy ≥ 99%) was considered. Alignment of edited sequences was performed in MEGA 7 using Clustal X2 algorithm to identify polymorphisms relative to PvMCA1 sequence from El Salvador reference strain (Sal-1; PlasmoDB: PVX\_114725). Additionally, for worldwide analysis, 112 nucleotide sequences for the complete catalytic domain of PvMCA1, as predicted using Pfam database (<https://pfam.xfam.org/>), were recovered from PlasmoDB and GenBank databases by BLAST and aligned to search for genetic variability. Metadata obtained were used to identify geographical distribution of the isolates recovered from these databases.

**Molecular modeling** - The sequence of G0ZIA8 (Sal-1; UniProtKB) was submitted to Blast, in the search of homologous proteins. The template (4AFR, *Trypanosoma brucei* metacaspase) found in PDB share 38.4% identity with G0ZIA8. After alignment with blast, the coverage is 32%. The e-value was 7e-35. The structural model of G0ZIA8 was constructed with MODELLER (<https://salilab.org/modeller/>). Fifty models were constructed and the best one was selected according to the DOPE score. The electrostatic surface potential was calculated by APBS software. The structural analysis was performed with Pymol.

To investigate the genetic diversity of PvMCA1, eighty-three wild isolates of *P. vivax* from Juruá Valley in the Brazilian Amazon were submitted to DNA sequencing for gene segment coding the consensus His372-Cys428 catalytic dyad (13). In contrast to work by Sow et al.,<sup>(15)</sup> in which the majority of isolates (24/28, 85.7%) presented amino acid substitution in both catalytic dyad and an upstream cysteine residue (Cys305) also inserted in the peptidase C14 domain, all the isolates herein studied showed complete nucleotide sequence identity each other as well as compared to *P. vivax* Sal-1 reference, with conservation of all the amino acid residues successfully sequenced (A288 to K446) (Fig. 1), supporting that the proteolytic activity of PvMCA1 may be critical to the parasite.

Since functional disruption of the single metacaspase (MCA1) in *Saccharomyces cerevisiae* by mutagenesis was already shown to induce *in vitro* drug-resistance as a result of refractoriness to apoptosis in the yeasts,<sup>(18)</sup> one possibility is that polymorphism of PvMCA1 could be related to chemoresistance phenomena reported in vivax malaria, whose occurrence is reported to be infrequent in Juruá Valley<sup>(19)</sup> and that was not characterised in our cross-sectional study. Indeed, metacaspases have been implicated in apoptosis-like cell-death pathways in different microorganisms<sup>(20)</sup> and drug-resistant strains of *P. falciparum* seem to be insensitive to chloroquine-induced apoptosis<sup>(21)</sup> as well as to anti-cell death effect promoted by inhibition of metacaspase activity.<sup>(22)</sup> Nevertheless, our preliminary study with recurrent infection in five *P. vivax* patients receiving appropriate antimalarial therapy (chloroquine/primaquine) at a Reference Center for ma-

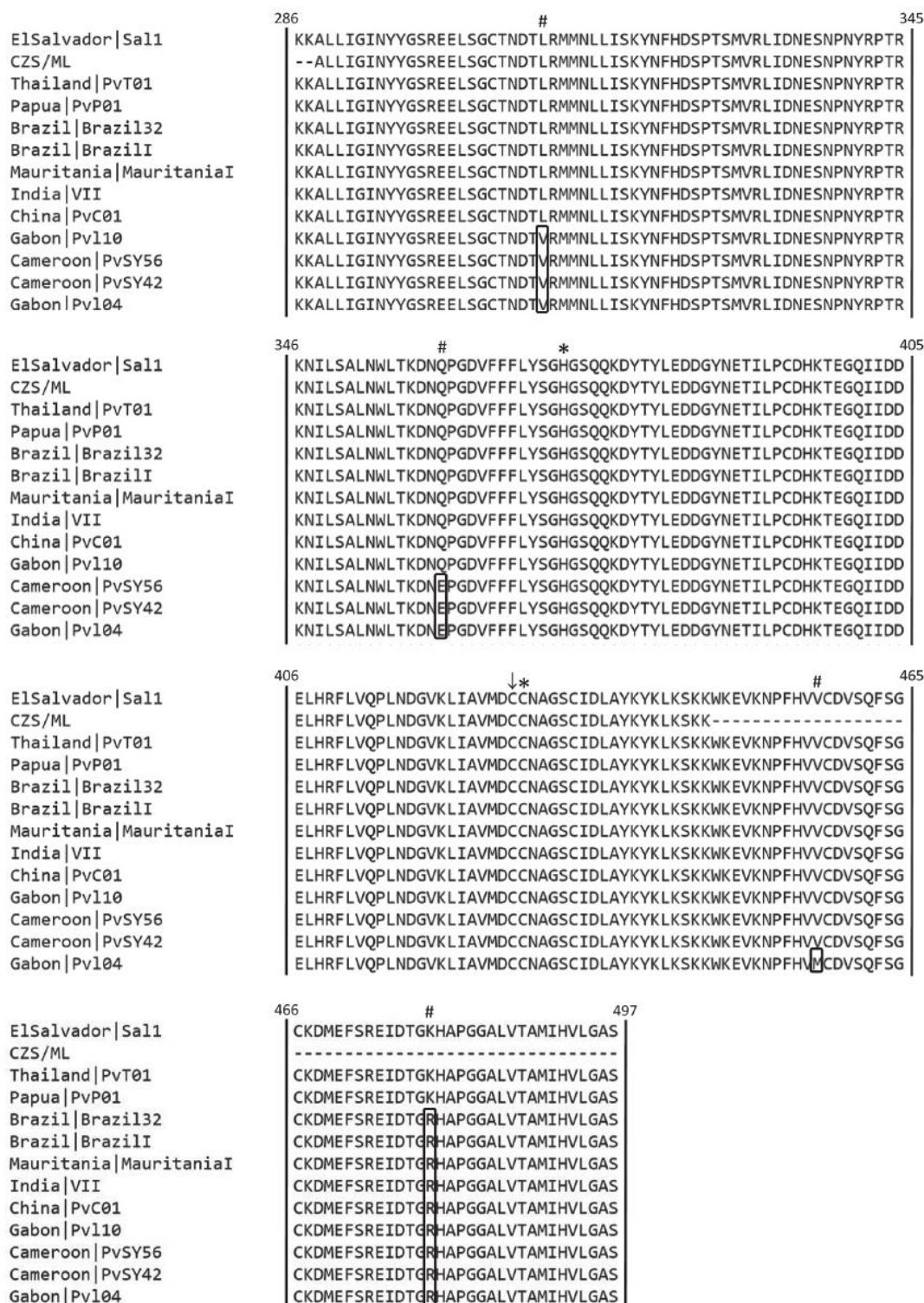


Fig. 1: multiple alignment of PvMCA1 peptidase domain from Brazilian Amazon field isolates and *Plasmodium vivax* strains from different endemic countries around the world. Deduced amino acid sequences of Peptidase\_C14 domain of PvMCA1 were obtained from 83 *P. vivax* isolates collected in two municipalities of the Juruá Valley (CZS: Cruzeiro do Sul and; Mâncio Lima: ML) and were, then, compared against sequences deduced from 112 *P. vivax* nucleotide genomic sequences available in GenBank and PlasmoDB, using Sal-1 as reference strain. Selected sequences are shown and the complete analysis is available in Supplementary data. The canonical His372-Cys428 catalytic dyad and the substitutions of amino acid residues are indicated by (\*) and (#), respectively. (↓) indicates the adjacent cysteine residue (Cys427) with possible involvement in protease activity. CZS/ML represents all field isolates studied, since complete identity was observed. Monkey-adapted strains are represented by Sal1, BrazilI, MauritaniaI and IndiaVII; clinical isolates by Brazil32, PvC01, PvT01 and PvP01 and; wild ape isolates by PvSY42, PvSY56, Pv104 and Pv110. (-): indicates non-determined amino acid residues.

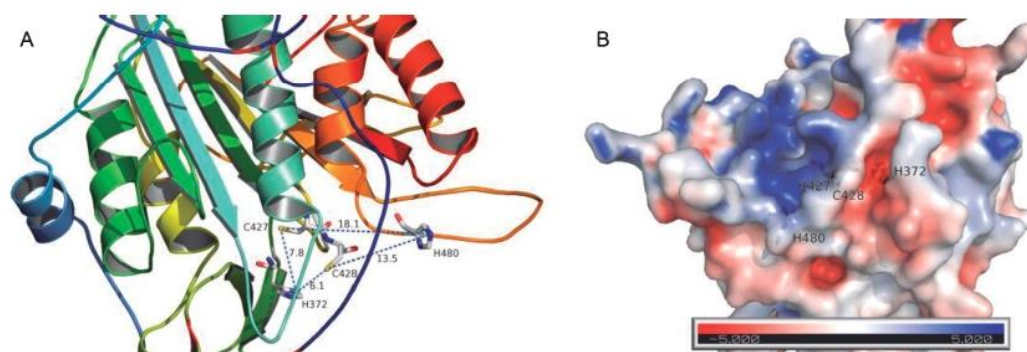


Fig. 2: prediction of catalytic dyad of *PvMCA1* by molecular modeling. (A) Three-dimensional structure of *PvMCA1* catalytic domain was modeled using comparative modeling and the distances (in Å) between the putative amino acid residues participating in catalytic dyad formation were estimated considering the Ne atom of histidine (H) imidazole ring and Sy atom of cysteine (C), which are crucial for the proteolytic process. (B) Electrostatic surface potential analysis of *PvMCA1* catalytic domain: negatively charged regions are shown in red and positively regions in blue.

laria in Manaus city, Amazonas state, does not indicate a relation between *PvMCA1* genetic diversity and parasite chemoresistance, as no mutation in the protease catalytic domain was detected in these patients (data not shown). Even so, the conclusion of the survey with a larger number of samples appropriately characterised in terms of parasite drug-sensitivity is needed to better clarify this issue.

In order to know the variability of *PvMCA1* worldwide, we extended our analysis to *P. vivax* isolates from different geographical regions whose genomic sequences are publicly available and, additionally, evaluated complete peptidase C14 domain (K286-S497), as predicted using Pfam database of protein families. Nucleotide sequence analysis of more than one hundred isolates from Americas, Africa, Asia and Indonesia, which included clinical and monkey-adapted strains as well as ape-infecting strains from Cameroon and Gabon (Supplementary data), revealed only four non-synonymous polymorphisms at position 310 (Leu to Val), 360 (Gln to Glu), 457 (Val to Met) and 479 (Lys to Arg) (Fig. 1). Three of them (L310V, Q360E, V457M) were restricted to wild ape parasites, with L310V substitution occurring markedly in all eight isolates analysed, while K479R substitution was the unique variation observed in the clinical and monkey-adapted isolates (Fig. 1 and Supplementary data). It is noteworthy that substitutions were not related to cysteine and histidine residues; even in the ape-infecting *P. vivax* strains, whose remarkable genetic diversity comparing to human strains suggests distinct demographic histories.<sup>(23)</sup> These data indicate, therefore, that the peptidase domain of *PvMCA1* presents evolutionary conservation of amino acid residues that are putatively involved in metacaspase activity, as described across diverse taxa.<sup>(24,25)</sup>

Similar results showing few polymorphic nucleotides with high conservation of essential amino acid residues required to catalytic site formation have previously been reported for other *P. vivax* proteases, such as vivapain-1, -2 and -3, plasmepsin-4 and *PvSERA-4*.<sup>(26,27,28)</sup> Curiously, the polymorphisms reported by Sow et al.<sup>(15)</sup> in *PvMCA1* peptidase domain were restricted to histidine and cysteine residues, including the putative H372-C428 catalytic dyad, which could impact protease

activity. Abrogation of proteolytic activity can indeed be achieved by site-specific mutagenesis of histidine and cysteine residues forming consensus catalytic dyad in metacaspases of *T. brucei* (*TbMCA2*), *Leishmania major* (*LmjMCA*) and *Candida albicans* (*CaMca1*).<sup>(29,30,31)</sup> But in other metacaspases this dyad seems not to be essential for catalytic activity, such as in *LdMCA1* of *L. donovani*,<sup>(32)</sup> and a secondary catalytic cysteine has been evidenced in *T. congolense* (*TcoMCA5*) as well as in the plant species *Arabidopsis thaliana* (*AtMC9*) and *Triticum aestivum* (*TaeMCAII*).<sup>(33,34,35)</sup>

This raises the possibility of alternative amino acid residues in *PvMCA1* compensating for the mutations previously reported by Sow and colleagues.<sup>(15)</sup> For instance, in *MCA1* of *P. berghei*, *P. chabaudi* and *P. yoelii* the predicted catalytic cysteine occurs immediately before of the consensus position, where a substitute residue (proline) is present.<sup>(14)</sup> The same is true for *T. brucei MCA4* (*TbMCA4*), in which the activity of such cysteine was experimentally demonstrated.<sup>(36)</sup> Interestingly, *PvMCA1* (Fig. 1; Cys427) and other metacaspases, including *MCA1* of *P. knowlesi* and *P. gallinaceum*, present a second conserved cysteine adjacently preceding the consensus catalytic cysteine<sup>(11,14)</sup> and the involvement in proteolytic activity has been shown as well.<sup>(29,30,35)</sup> Notably, substitution of this alternative cysteine is not found in any of the *P. vivax* isolates analysed until now (Cys427), indicating by its high degree of conservation a possible role in *PvMCA1* activity.

We then predicted the three-dimensional structure of *PvMCA1* catalytic domain by homology modeling to examine if C427 and additional histidine residues could, in some extent, participate in catalytic site formation. As shown in Fig. 2, the area harboring the canonical catalytic dyad (His372-Cys428) presented typical electrostatic potential of metacaspase catalytic pocket (Fig. 2B), which is endowed with negative charges and confers specificity toward substrates containing basic arginine or lysine residues,<sup>(13,24)</sup> while Cys427 was located in a more positively charged area (Fig. 2B). On the other hand, the proximity of both Cys427 (7.8 Å) and Cys428 (6.1 Å) to His372 residue was shown to be consistent with the active site reported for some cysteine proteases

(Fig. 2A), such as legumains, caspases and metacaspases.<sup>(34,37,38)</sup> In the single metacaspase of *S. cerevisiae* (YCA1), for instance, the distance between catalytic residues (Cys-His) was about 9.2 Å, while the nearest histidine (5.8 Å) was not implicated in the proteolytic process,<sup>(35)</sup> supporting that Cys427 could participate in the activity of PvMCA1. In this context, an additional histidine residue (His480) was also identified in the vicinity of the canonical catalytic dyad but, unless a conformational change occurs before catalytic site activity, His480 does not seem to constitute a partner residue for Cys427 or Cys 428, since it is >13.0 Å away (Fig. 2A).

In summary, although mutations in the putative catalytic dyad of PvMCA1 have previously been reported in field isolates from Mauritania, Sudan and Oman, a highly conserved peptidase domain of PvMCA1 was remarkably observed in Brazilian Amazon as well as between *P. vivax* isolates from different endemic countries around the world, which can contribute to eligibility of this metacaspase as a druggable target candidate in vivax malaria. Nevertheless, further studies aiming biochemical and functional characterisation of PvMCA1, together to identification of amino acid residues that effectively participate in the proteolytic process are still required to elucidate the role of PvMCA1 in *P. vivax* biology.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To DNA Sequencing facility of Fiocruz-RJ (P01-001) for the support in sequencing assays.

#### AUTHORS' CONTRIBUTION

Conceptualisation - HASS and PRRT; investigation and methodology - HASS, VFE, CMB, BOB, JPB and EKPR; formal analysis - ABMR, ACRG, FFM and JHMS; resources - GCM, MVGL, RMS, JCLJ, CTDR, LRPR and PRRT; writing - original draft preparation - HAS and PRRT; writing - review and editing - MVGL, CTDR, LRPR and PRRT; supervision - PRRT.

#### REFERENCES

- Antony HA, Parija SC. Antimalarial drug resistance: an overview. *Trop Parasitol.* 2016; 6(1): 30-41.
- WHO - World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva: WHO; 2019. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721>.
- Dondorp AM, Smithuis FM, Woodrow C, von Seidlein L. How to contain artemisinin- and multidrug-resistant falciparum malaria. *Trends Parasitol.* 2017; 33(5): 353-63.
- Renapurkar DM, Pradhan VR, Sutar NK, Deshmukh RA, Pandit CH, Marathe SN. Micro test for assaying sensitivity of *Plasmodium vivax* in vitro. *Chemotherapy.* 1989; 35(3): 160-3.
- Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet.* 1989; 2(8673): 1183-4.
- Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14(10): 982-91.
- Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector Borne Dis.* 2018; 55(1): 1-8.
- Thomas D, Tazerouni H, Sundararaj KGS, Cooper JC. Therapeutic failure of primaquine and need for new medicines in radical cure of *Plasmodium vivax*. *Acta Trop.* 2016; 160: 35-8.
- Levy MR, Chou SC. Inhibition of macromolecular synthesis in the malarial parasites by inhibitors of proteolytic enzymes. *Experientia.* 1975; 31(1): 52-4.
- Rosenthal PJ. Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4(1): 49-57.
- Kumar B, Mohammad T, Amaduddin, Hussain A, Islam A, Ahmad F, et al. Targeting metacaspase-3 from *Plasmodium falciparum* towards antimalarial therapy: a combined approach of *in-silico* and *in-vitro* investigation. *J Biomol Struct Dyn.* 2021; 39(2): 421-30.
- Vandana, Shankar S, Prasad KM, Kashif M, Kalia I, Rai R, et al. A nonpeptidyl molecule modulates apoptosis-like cell death by inhibiting *P. falciparum* metacaspase-2. *Biochem J.* 2020; 477(7): 1323-44.
- Klemenčič M, Funk C. Structural and functional diversity of caspase homologues in non-metazoan organisms. *Protoplasma.* 2018; 255(1): 387-97.
- Le Chat L, Sinden RE, Dessens JT. The role of metacaspase 1 in *Plasmodium berghei* development and apoptosis. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 153(1): 41-7.
- Sow F, Bonnot G, Ahmed BR, Diagana SM, Kebe H, Koita M, et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* metacaspase 1 and *Plasmodium vivax* multi-drug resistance 1 genes of field isolates from Mauritania, Sudan and Oman. *Malar J.* 2017; 16(1): 61.
- Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J.* 2016; 15(1): 284.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 61(2): 315-20.
- Biswas C, Zuo X, Chen SCA, Schibeci SD, Forwood JK, Jolliffe KA, et al. Functional disruption of yeast metacaspase, Mcal, leads to miltefosine resistance and inability to mediate miltefosine-induced apoptotic effects. *Fungal Genet Biol.* 2014; 67: 71-81.
- de Oliveira TC, Corder RM, Early A, Rodrigues PT, Ladeia-Andrade S, Alves JMP, et al. Population genomics reveals the expansion of highly inbred *Plasmodium vivax* lineages in the main malaria hotspot of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14(10): e0008808.
- Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV. Metacaspases. *Cell Death Differ.* 2011; 18(8): 1279-88.
- Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, Ambroise-Thomas P. Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91(5): 590-1.
- Meslin B, Beavogui AH, Fasel N, Picot S. *Plasmodium falciparum* metacaspase PfMCA-1 triggers a z-VAD-fmk inhibitable protease to promote cell death. *PLoS One.* 2011; 6(8): e23867.
- Loy DE, Plenderleith LJ, Sundararaman SA, Liu W, Gruszczyk J, Chen YJ, et al. Evolutionary history of human *Plasmodium vivax* revealed by genome-wide analyses of related ape parasites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115(36): E8450-9.
- Klemenčič M, Asplund-Samuelsson J, Dolinar M, Funk C. Phylogenetic distribution and diversity of bacterial pseudo-orthocaspases underline their putative role in photosynthesis. *Front Plant Sci.* 2019; 10: 293.
- Kumar B, Verma S, Kashif M, Sharma R, Atul, Dixit R, et al. Metacaspase-3 of *Plasmodium falciparum*: an atypical trypsin-like serine protease. *Int J Biol Macromol.* 2019; 138: 309-20.



26. Na BK, Shenai BR, Sijwali PS, Choe Y, Pandey KC, Singh A, et al. Identification and biochemical characterization of vivapains, cysteine proteases of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Biochem J*. 2004; 378(Pt 2): 529-38.
27. Rawat M, Vijay S, Gupta Y, Dixit R, Tiwari PK, Sharma A. Sequence homology and structural analysis of plasmepsin 4 isolated from Indian *Plasmodium vivax* isolates. *Infect Genet Evol*. 2011; 11(5): 924-33.
28. Rahul CN, Shiva Krishna K, Pawar AP, Bai M, Kumar V, Phadke S, et al. Genetic and structural characterization of PvSERA4: potential implication as therapeutic target for *Plasmodium vivax* malaria. *J Biomol Struct Dyn*. 2014; 32(4): 580-90.
29. González IJ, Desponds C, Schaff C, Mottram JC, Fasel N. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *Int J Parasitol*. 2007; 37(2): 161-72.
30. Moss CX, Westrop GD, Juliano L, Coombs GH, Mottram JC. Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. *FEBS Lett*. 2007; 581(29): 5635-9.
31. Jeong JH, Lee SE, Kim J. Mutational analysis of metacaspase CaMcal and decapping activator Edc3 in the pathogenicity of *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*. 2016; 97: 18-23.
32. Lee N, Gannavaram S, Selvapandiyam A, Debrabant A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot Cell*. 2007; 6(10): 1745-57.
33. Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackenier A, Inzé D, Delledonne M, et al. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem*. 2007; 282(2): 1352-8.
34. Piszczek E, Dudkiewicz M, Mielecki M. Biochemical and bioinformatic characterization of type II metacaspase protein (TaeM-CaII) from wheat. *Plant Mol Biol Report*. 2012; 30(6): 1338-47.
35. Eyssen LEA, Coetzer THT. Expression, purification and characterisation of *Trypanosoma congolense* metacaspase 5 (TcoMCA5) - a potential drug target for animal African trypanosomiasis. *Protein Expr Purif*. 2019; 164: 105465.
36. Szallies A, Kubata BK, Duszhenko M. A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 2002; 517(1-3): 144-50.
37. Wong AHH, Yan C, Shi Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *J Biol Chem*. 2012; 287(35): 29251-9.
38. Elsässer B, Zauner FB, Messner J, Soh WT, Dall E, Brandstette H. Distinct roles of catalytic cysteine and histidine in the protease and ligase mechanisms of human legumain as revealed by DFT-based QM/MM simulations. *ACS Catal*. 2017; 7(9): 5585-93.