

**VANESSA CRISTINA NICOLETE**

**ANTICORPOS CONTRA A PROTEÍNA DE LIGAÇÃO EM DUFFY  
(PvDBP) E PROTEÇÃO CONTRA A MALÁRIA VIVAX NA  
AMAZÔNIA RURAL BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2017

VANESSA CRISTINA NICOLETE

**Anticorpos contra a proteína de ligação em Duffy (PvDBP) e proteção contra a malária vivax na Amazônia rural brasileira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nicolete, Vanessa Cristina

Anticorpos contra a proteína de ligação em Duffy (PvDBP) e proteção contra a malária vivax na Amazônia rural brasileira / Vanessa Cristina Nicolete; orientador Marcelo Urbano Ferreira. -- São Paulo, 2017.

186 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasmodium vivax. 2. Anticorpos anti-PvDBP. 3. Amazônia Brasileira. 4. Proteção. 5. Anticorpos monoclonais. I. Ferreira, Marcelo Urbano, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Vanessa Cristina Nicolete

Título da Tese: Anticorpos contra a proteína de ligação em Duffy (PvDBP) e proteção contra a malária vivax na Amazônia rural brasileira

Orientador: Dr. Marcelo Urbano Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

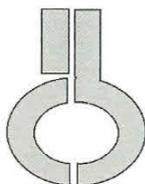
(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

PARECER 1130/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data **APROVOU** o projeto intitulado: "*Anticorpos contra a proteína de ligação em Duffy (PvDBP) e proteção contra a malária vivax na Amazônia rural brasileira*" do pesquisador MARCELO URBANO FERREIRA e aluna VANESSA CRISTINA NICOLETE.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final ), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c. conforme modelo constante no [site.icb.usp.br](http://site.icb.usp.br).

*Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.*

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **14.08.2014**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A.ZANOTTO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

*Aos meu pais,  
**Jair Nicolete e Marli Nicolete,**  
por todo o apoio e compreensão  
nessa etapa da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço aos meus queridos pais, **Jair e Marli Nicolete** pelo total apoio nos meus anos dedicados a pós-graduação. Sem a ajuda de vocês eu não teria chegado tão longe! Obrigada por acreditarem nos meus sonhos, por dividirem minhas angústias, incertezas e por muitas vezes me socorrerem tanto emocional, como financeiramente. Essa conquista é nossa! Obrigada pela dedicação e zelo pelo meu bem estar!*

*Ao meu orientador **Dr. Marcelo Urbano Ferreira**, pela confiança em me dedicar esse trabalho tão lindo. Obrigada pelas discussões, pelas ideias sobre como analisar melhor os dados, pelos artigos trocados e por me dar a oportunidade de estar tantas vezes fora do Brasil e em contato com pesquisadores tão renomados. Agradeço pelas oportunidades de realização de trabalho de campo, saber o nome e a história que carrega cada microtubo, com certeza tornou meu trabalho muito mais emocionante.*

*A equipe do Laboratório do Professor **Dr. Christopher King**, que me recebeu com tanto carinho durante minhas duas estadias na Case Western Reserve University. Agradeço especialmente a **Lenore Carias**, técnica do laboratório, pela imensa paciência e dedicação em me treinar e ensinar toda a metodologia dos anticorpos monoclonais. Além de uma cientista, Lenore é uma pessoa incrível! Ao **Dr. King**, por toda sua simpatia, educação, preocupação com meu bem-estar e discussões sobre nossos resultados. A toda a equipe, meu mais sincero agradecimento por ter tornado essa desafiante estadia em um momento muito especial!*

*A todos os amigos que fiz em Cleveland, especialmente **Larissa Guimarães, Luiz Felipe Martins e Daniella Victorino**. **Larissa**, muito além dos meus resultados, Cleveland foi a desculpa para encontrar uma irmã perdida. Obrigada pelo seu cuidado, pela amizade tão presente e por todos os momentos felizes que nossa estadia nos proporcionou. **Felipe**, obrigada por me fazer conhecer o melhor churrasco gaúcho em terras estadunidenses. **Dani**, obrigada pela amizade sempre presente e a companhia constante nessa terra do gelo! Você com certeza tornou meus dias mais felizes e leves na Clevelândia!*

*Agradeço a família que me acolheu em Cleveland: **Ana Maria Ramos, Dr. Ronald Blanton e Leonardo Blanton.** Ana, obrigada pela preocupação de mãe, pelas conversas de domingo e a sopa quentinha me esperando no inverno rigoroso, que tanto aquecia meu coração. Ao **Dr. Ronald Blanton, Ron,** eu agradeço pelo melhor turkey do Thanksgiving e por me acordar ao som de chorinho aos domingos, acompanhado de panquecas, sausages e ovos mexidos que só um americano (ou seria um baiano?) sabe fazer! Obrigada por me incentivar na carreira acadêmica e por sempre torcer por mim.*

*A equipe do laboratório do MUF: **Melissa Bastos, Nathália Lima, Raquel Muller, Pablo Fontoura, Danielle Vega, Jaques Franco, Anaclara Pincelli, Simone Ladeia-Andrade, Thais Crippa, Lais Salla e Rodrigo Corder,** muito obrigada pelos ótimos momentos vividos no laboratório e fora dele! Em especial agradeço **Maria José Menezes,** minha querida amiga Zezé, por seu enorme coração e boa vontade em me ajudar. Agradeço todo seu auxílio para o desenvolvimento da minha tese e fico imensamente feliz que nesse processo eu tenha conquistado algo tão valioso como sua amizade. **Priscila Thihara,** eu agradeço por toda a cumplicidade, apoio e amizade dedicada por tantos anos! Agradeço especialmente a **Suzana do Carmo,** que durante meu doutorado ocupava a posição de pós-doc em nosso laboratório. Meu muito obrigada, de coração, por toda ajuda na análise dos dados e pela dedicação desmedida!*

*Ao **Dr. Rodrigo Abensur Athanazio,** meu médico pneumologista, por me apoiar e incentivar em todas as desafiadoras escolhas que fiz ao longo desses 4 anos de doutoramento. Obrigada pelos puxões de orelha necessários, pela disponibilidade irrestrita e por sua constante preocupação com minha saúde física e mental.*

*Por fim, agradeço imensamente a **população do Remansinho** que tão gentilmente nos cedeu todas as amostras do trabalho. Levo no coração cada sorriso, cada história de sofrimento e alegria contadas docemente por um povo tão sofrido e com imensa sabedoria. Esses 7 anos trabalho só aumentaram minha admiração, respeito e simpatia pela Região Norte do meu país!*

***Muito obrigada!!***

### **Agradecimento ao CNPq**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado (Processo 141313/2013-7) e doutorado-sanduíche (Processos 211666/2013-0 e 233912/2014-2) concedidas que permitiram o desenvolvimento desta tese e o estágio doutoral na Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, Estados Unidos.

*“Descobri que Plasmodium knowlesi não era capaz de invadir hemácias do grupo sanguíneo Duffy negativo. Eu fui à biblioteca naquela noite e percebi logo que estava no caminho certo. Eu tinha descoberto o fator que faltava para explicar a resistência dos africanos ocidentais a Plasmodium vivax”*

*Louis Miller*

## RESUMO

NICOLETE, V. C. **Anticorpos contra Duffy Binding Protein (PvDBP) e proteção contra malária vivax na Amazônia rural brasileira.** 2017. 186 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

No Brasil 99,8% de todos os casos de malária são oriundos da região Amazônica e 88% deles são causados por *Plasmodium vivax*. Merozoítos de *P. vivax* reconhecem receptores na superfície das células hospedeiras para selecionar reticulócitos, entretanto, o ligante crítico do parasita é o domínio II de *Duffy binding protein* (PvDBP). PvDBP se liga especificamente na glicoproteína presente na membrana do eritrócito, nomeada antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (DARC). Nesta tese, nós testamos se anticorpos naturalmente adquiridos anti-PvDBPII conferem proteção clínica para malária vivax em indivíduos de um assentamento rural no Amazonas, expostos a baixos níveis de transmissão de malária. Nós avaliamos as respostas de anticorpos IgG em 1126 amostras de plasmas de 466 indivíduos (cada indivíduo contribuiu com 1 a 7 amostras), utilizando um ensaio multiplex com microesferas conjugadas a cinco antígenos variantes da região II de PvDBP (Sal I, AH, P, O e C) e três proteínas de superfície de merozoítos. Entre 64% e 85% das amostras testadas possuíam anticorpos IgG para as variantes de PvDBPII testadas. Contudo, análises de sobrevivência utilizando modelo de Cox não encontraram associação entre altos níveis de resposta para nenhuma das proteínas PvDBP ou antígenos de superfície e tempo para a próxima malária vivax. A presença de anticorpos inibitórios capazes de bloquear a ligação entre a variante Sal I de PvDBP em DARC foram encontrados em 23,2% (133) das 572 amostras analisadas e indicaram alta atividade de inibição ( $\geq 90\%$ ) *in vitro*. Análises posteriores revelaram que anticorpos anti-PvDBP Sal I altamente inibitórios foram cepa-transcendentes. A distribuição da frequência de porcentagem de atividade inibição dos anticorpos naturalmente adquiridos foi claramente bimodal, de forma que a maioria das amostras possuíam altas ou nenhuma atividade de bloqueio. Indivíduos com atividade de bloqueio ( $\geq 50\%$  de inibição de ligação) revelaram um atraso no tempo para o próximo episódio de malária vivax comparado com aqueles com baixa atividade de bloqueio ( $< 6\%$ ) ou nenhuma atividade inibitória ([HR] = 0.51;  $P = 0.03$ ). Para obtenção de anticorpos monoclonais (mAbs) anti-PvDBPII de indivíduos do Amazonas naturalmente expostos à *P. vivax* foi realizado um *sorting* de células B de memória específicas para PvDBPII, IgG+, de dois indivíduos que previamente revelaram possuir altas respostas inibitórias contra PvDBP Sal I. As cadeias leve e pesada foram amplificadas por PCR e clonadas dentro de um vetor de expressão para gerar anticorpos monoclonais humanos. Um desses mAbs (#134/135) reconheceu PvDBP Sal I por ELISA e foi capaz de inibir a ligação entre eritrócitos FY\*A mais eficientemente do que FY\*B. Ensaio de competição baseado em ELISA revelaram que 170 amostras de plasmas de indivíduos com altos níveis de anticorpos inibitórios objetivam o mesmo epítopo ou similar reconhecido pelo mAb 134/135. Por fim, mAb 134/135 foi capaz de parcialmente inibir a invasão de merozoítos de *P. vivax* em culturas *in vitro*.

**Palavras-chave:** Plasmodium. PvDBP. Anticorpos. Proteção. mAb.

## ABSTRACT

NICOLETE, V. C. **Antibodies against Duffy Binding Protein (PvDBP) and protection against vivax malaria in Brazilian rural Amazon.** 2017. 186 p. Ph. D. Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In Brazil 99.8% of all malaria cases come from the Amazon region; 88% of them are caused by *Plasmodium vivax*. Merozoites of *P. vivax* recognize receptors on the host cell surface to selectively invade reticulocytes. A critical parasite ligand is the domain II of Duffy binding protein (PvDBPII), which binds specifically to an erythrocyte membrane glycoprotein, namely Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). In this thesis, we tested whether naturally acquired antibodies to PvDBPII conferred protection against clinical vivax malaria in rural Amazonians exposed to low-level malaria transmission. We measured specific IgG antibodies in 1126 plasma samples from 466 individuals (1-7 samples per subject), using a multiplex assay with antigen-conjugated microspheres, to five different variants of region II of PvDBP (Sal I, AH, P, O and C) and three merozoite surface antigens. Between 64% and 85% of samples tested, had IgG antibodies to these PvDBPII variants. However, survival analysis using multilevel Cox models found no association between high-level antibody responses to either PvDBPII or merozoite surface antigens and time to the next laboratory-confirmed *P. vivax* malaria episode. We further tested whether the presence of antibodies that are able to block binding of the Sal I variant of PvDBPII to DARC (binding-inhibitory antibodies [BIABs]) was associated with clinical immunity and found that 27.8% (133) of the 572 samples analyzed displayed high blocking activity ( $\geq 90\%$ ) *in vitro*. Further, the high-level BIABs were predominantly broadly reactive against PvDBPII variants (i.e., variant-transcending.) The frequency distribution of percent blocking activity of naturally acquired antibodies was clearly bimodal, so most samples have either high or negligible blocking activity. We found that subjects with high ( $\geq 50\%$  blocking activity) had a delay in their time to the next vivax malaria episode, compared with subjects with low-level ( $< 6\%$ ) or no inhibitory activity (hazard ratio [HR] = 0.51;  $P = 0.03$ ). To obtain monoclonal antibodies (mAbs) against PvDBPII from naturally exposed Amazonians, we sorted single PvDBPII-specific IgG<sup>+</sup> memory B cells from two subjects previously shown to have high-level BIAB responses, PCR amplified their IgG heavy and light chain variable regions, and cloned them into a human IgG expression vector to generate human monoclonal antibodies. One of these mAbs (#134/135) recognized PvDBPII by ELISA and inhibited PvDBPII binding to FY\*A erythrocytes more efficiently than FY\*B erythrocytes. We next used competition ELISA to test whether naturally acquired antibodies from 170 plasma samples with high levels of BIABs targeted the same epitope(s) recognized by the blocking-inhibitory 134/135 mAb. Finally, we showed that the 134/135 MoAb was able to partially inhibit red blood cell invasion by *P. vivax* merozoites in short-term *in vitro* culture.

**Keywords:** Plasmodium. PvDBP. Antibodies. Protection. mAb.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição geográfica da transmissão de malária no mundo .....	23
<b>Figura 2</b> – Distribuição de casos de malária no Brasil, no ano de 2015 .....	24
<b>Figura 3</b> - Ciclo de vida dos plasmódios que infectam o homem. Neste ciclo não estão representados os hipnozoítos de <i>P. vivax</i> e <i>P. ovale</i> . As etapas de desenvolvimento do parasita no vetor estão simplificadas .....	29
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática do gene <i>FY</i> do grupo sanguíneo Duffy, incluindo a região promotora e os dois éxons .....	33
<b>Figura 5</b> – Frequência global de alelos <i>FY</i> .....	35
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática de estruturas e organelas do merozoíto de <i>Plasmodium</i> .....	38
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática do processo de invasão do merozoíto em eritrócitos .....	39
<b>Figura 8</b> – Processamento da proteína MSP-1 .....	44
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática da proteína da proteína MSP-3 $\alpha$ de <i>Plasmodium vivax</i> . As regiões com alta predição para formação de “coiled coil” estão destacadas em preto .....	47
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática da proteína MSP-9 de <i>P. vivax</i> .....	49
<b>Figura 11</b> – Mecanismo hipotético de interação entre AMA-1 de <i>Plasmodium spp.</i> e o eritrócito do hospedeiro .....	53
<b>Figura 12</b> – Comparação estrutural dos genes de <i>P. vivax</i> , <i>P. knowlesi</i> e <i>P. falciparum</i> .....	56
<b>Figura 13</b> – Modelo de interação DBP-DARC durante o processo de invasão .....	57
<b>Figura 14</b> – Mapa mostrando a localização da área do estudo de campo, Remansinho, sul do estado do Amazonas, na Amazônia Brasileira. O mapa também mostra a vila de Nova Califórnia (oeste do estado de Rondônia), a cidade mais próxima, Acrelândia (leste do estado do Acre), onde se encontrava o laboratório de campo e a BR 364 estrada interestadual, que conecta Acre, Rondônia e o sul do Amazonas com o resto do país .....	66
<b>Figura 15</b> – Representação do Ensaio de inibição de ligação baseado em microplaca. A placa de 96 poços foi previamente sensibilizada com nDARC-Fc .....	74
<b>Figura 16</b> – Representação do ensaio de competição por sítio de ligação. Na Figura A, a competição é confirmada através da ausência de cor no poço-teste, após revelação com TMB. Isso é determinado porque a variante de PvDBP utilizada é biotinizada e tem afinidade por Streptavidina (conjugada HRP) utilizada no ensaio. Se o anticorpo naturalmente adquirido anti- PvDBP encontrado plasma testado tem como alvo o mesmo sítio que o anticorpo monoclonal expresso, o primeiro se ligará com mais afinidade a proteína durante o período de pré-incubação entre o plasma e a variante de PvDBP. Caso essa afinidade seja fraca ou inexistente, tanto o anticorpo naturalmente adquirido como o anticorpo monoclonal aderido na placa se ligarão ao seu próprio sítio de reconhecimento e não haverá competição, confirmado pela presença de cor no poço-teste após revelação (Figura B) .....	93

**Figura 17** – Processo de filtragem para remoção de leucócitos a partir de pequeno volume de sangue. A Figura A mostra como adaptar o filtro comercial para depleção de células brancas. Note que a bolsa de armazenamento e o adaptador devem ser removidos. A Figura B exibe o filtro adaptado sendo utilizado em fluxo laminar. O sangue deve ser inserido com uma seringa de 20 mL no conector antes do filtro e após a passagem, coletado na outra extremidade também com uma seringa de 20 mL. Após a filtragem, o sistema foi lavado com meio McCoy 5A incompleto, com propósito de remover o máximo de hemácias que poderiam estar retidas no filtro ..... 94

**Figura 18** – Prevalência de anticorpos IgG para cinco variantes de *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* (PvDBP) nos indivíduos do estudo de acordo com a idade ..... 100

**Figura 19** – Variação temporal na prevalência de *Plasmodium vivax* e níveis de anticorpos IgG para *Duffy binding protein* (PvDBP Sal I) e a região C- terminal de 19kDa de proteína 1 de superfície de merozoíto (PvMSP-1<sub>19</sub>) nos indivíduos do assentamento rural Remansinho, no Estado do Amazonas. Em A, a prevalência de *P. vivax* detectada por microscopia e/ou diagnóstico quantitativo com reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) durante os 37 meses de estudo (linha sólida); as linhas pontilhadas representam intervalo de confiança de 95%. Em B e C, encontram-se as medianas de índice de reatividade de anticorpos IgG para PvDBP Sal I (B) e PvMSP-1<sub>19</sub> (C), detectados através do ensaio multiplex durante os inquéritos transversais (linha sólida); as linhas pontilhadas representam os intervalos interquartis ..... 104

**Figura 20** – Nível de anticorpos IgG para vários antígenos de malária em relação ao tempo do estudo, nos indivíduos do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil, durante os anos de 2010-2013. Nos gráficos das proteínas as linhas contínuas indicam a mediana dos índices de reatividade dos anticorpos para PvDBP AH, PvDBP C, PvDBP P, PvDBP O, PvMSP-3 $\alpha$ , PvMSP-9 e PfEBA-175, detectados pelo ensaio multiplex baseado em microesferas durante os sete inquéritos transversais. As linhas pontilhadas representam os intervalos interquartis. O gráfico da prevalência de *Plasmodium falciparum*, encontrada no canto inferior direito, mostra a parasitemia detectada por microscopia e/ou qPCR durante o mesmo período de tempo, intervalos de confiança de 95% são representados pelas linhas pontilhadas ..... 106

**Figura 21** – Variação nos níveis de anticorpos IgG naturalmente adquiridos para antígenos de estágio assexual sanguíneo de *Plasmodium vivax* e para um antígeno de *Plasmodium falciparum* (PfEBA-175) em função da ocorrência de um episódio de malária vivax na população do estudo entre os anos de 2010-2013. Os níveis de anticorpos são expressos como logaritmo natural do índice de reatividade ..... 108

**Figura 22** – *Boosting* de anticorpos IgG naturalmente adquiridos após episódio de malária causada por *Plasmodium vivax* na população do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil. Os níveis de anticorpos estão expressos em índices de reatividade. As linhas contínuas mostram os valores das medianas e as pontilhadas representam os intervalos interquartis ..... 109

**Figura 23** – Incidência de *Plasmodium vivax* na população de estudo entre março de 2010 a agosto de 2013. As linhas contínuas representam a incidência (casos/pessoas-mês), as linhas pontilhadas mostram os intervalos de confiança de 95% ..... 110

**Figura 24** – Proporção de indivíduos do estudo que permaneceram livres de malária vivax clínica diagnosticada por microscópio, de acordo com os níveis de anticorpos para as variantes de *Duffy Binding Protein* (PvDBP) AH, Sal I, P, C e O, as proteínas de superfície de merozoíto PvMSP-1<sub>19</sub>, PvMSP-3 $\alpha$  e PvMSP-9 ..... 113

<b>Figura 25</b> – Distribuição da frequência de porcentagem de inibição de ligação entre anticorpos IgG anti-PvDBP e nDARC-Fc em 263 indivíduos do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil .....	115
<b>Figura 26</b> – Avaliações sequenciais de atividade de inibição de ligação de anticorpos naturalmente adquiridos para <i>Duffy binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i> (PvDBP) de 43 participantes do estudo que tiveram pelo menos um registro de atividade inibitória acima de 80% .....	117
<b>Figura 27</b> – Comparação por pares de títulos de anticorpos com atividade inibitória para <i>Duffy Binding Protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i> em indivíduos do assentamento rural no estado do Amazonas, Brasil .....	119
<b>Figura 28</b> – Curva de Kaplan-Meier mostrando a proporção de indivíduos que permaneceram livres de malária vivax clínica confirmada por microscópio durante o estudo, de acordo com os níveis de atividade inibitória dos anticorpos anti- PvDBP .....	120
<b>Figura 29</b> – Local do <i>sorting-gate</i> para células IgG+, CD20+, CD19+, PvDBP II Sal I+ da amostra 208 (A) e amostra 53 (B) .....	123
<b>Figura 30</b> – Gel de policrilamida realizado após a purificação do anticorpo monoclonal brasileiro anti-PvDBP 134/135 .....	125
<b>Figura 31</b> – Inibição de ligação de PvDBP Sal I em hemácias de diferentes genótipos DARC pelo anticorpo monoclonal anti-PvDBP II, nomeado 134/135 .....	126
<b>Figura 32</b> – Porcentagem de competição por epítipo de ligação em PvDBP Sal I entre o anticorpo monoclonal brasileiro (134/135) e 170 amostras de plasmas apresentando anticorpos anti-PvDBP com alta atividade de inibição de ligação entre PvDBP Sal I em nDARC-Fc, em diferentes concentrações .....	128
<b>Figura 33</b> – Persistência de competição por sítio de ligação (ou similar) em PvDBP Sal I entre plasmas com anticorpos de alta atividade inibitória e o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135, ao longo do estudo .....	129
<b>Figura 34</b> – Correlação entre anticorpos anti- PvDBP II naturalmente adquiridos com alta capacidade de inibição de ligação entre PvDBP Sal I e nDARC e competição pelo mesmo epítipo (ou similar) de ligação em PvDBP Sal I com o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135. Os plasmas contendo os anticorpos anti-PvDBP naturalmente adquiridos foram diluídos em diferentes concentrações .....	130
<b>Figura 35</b> – Correlação entre competição por sítio de ligação em PvDBP Sal I entre o anticorpo monoclonal anti-PvDBP II brasileiro (134/135) e os anticorpos monoclonais anti-PvDBP II do Camboja 99/100 (A) e 92/96 (B) .....	131
<b>Figura 36</b> – Inibição dose-dependente de invasão de <i>Plasmodium vivax</i> em reticulócitos .....	132
<b>Figura 37</b> – Ensaio de inibição de invasão de <i>Plasmodium vivax</i> em hemácias <i>ex vivo</i> .....	134
<b>Figura 38</b> – Anticorpos monoclonais humanos anti-PvDBP Sal I inibem parcialmente a invasão de <i>Plasmodium vivax</i> em hemácias .....	135

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Descrição das amostras, tipo de separação magnética e colorações que foram utilizadas na citometria e <i>sorting</i> .....	78
<b>Tabela 2</b> – Conjunto de oligonucleotídeos utilizados na primeira PCR das cadeias das imunoglobulinas .....	81
<b>Tabela 3</b> – Conjunto de oligonucleotídeos utilizados na segunda PCR das cadeias das imunoglobulinas .....	82
<b>Tabela 4</b> – Oligonucleotídeos utilizados para a PCR específica das cadeias das imunoglobulinas .....	84
<b>Tabela 5</b> – Proporção (%) de amostras dos indivíduos do assentamento rural no estado do Amazonas (n= 1126), Remansinho, com anticorpos IgG para cinco variantes de <i>Plasmodium vivax</i> Duffy binding protein (PvDBP), três proteínas de superfície de merozoíto de <i>P. vivax</i> e um antígeno estágio sanguíneo de <i>P. falciparum</i> , entre os anos de 2010-2013 .....	99
<b>Tabela 6</b> – Coeficiente de correlação de Spearman entre idade e níveis de anticorpos IgG para todas as variantes de PvDBP, proteínas de superfície de merozoíto (MSP) e PfEBA-175, em 451 indivíduos do estudo com idade conhecida .....	101
<b>Tabela 7</b> – Resíduos de aminoácidos polimórficos presentes no domínio II de PvDBP de 46 isolados provenientes do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil (nos anos de 2010-2011), comparados com PvDBP Sal I e quatro variantes de PvDBP de Papua Nova Guiné (AH, C, P e O) que foram expressas como proteínas recombinantes nesse estudo .....	102
<b>Tabela 8</b> – Coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) (acima da diagonal) e seu valor de <i>P</i> correspondente (abaixo da diagonal) dos níveis de anticorpos pareados entre as cinco variantes de PvDBP em 466 indivíduos do estudo .....	102
<b>Tabela 9</b> – Mediana de níveis de anticorpos para antígenos de estágio-sanguíneo da malária em amostras de plasmas coletadas de assintomáticos e sintomáticos infectados com <i>Plasmodium vivax</i> , no assentamento rural no estado do Amazonas, Brasil .....	111
<b>Tabela 10</b> – Associação entre níveis de anticorpos naturalmente adquiridos para variantes de PvDBP e PvMSP e risco prospectivo de malária vivax clínica em indivíduos do assentamento rural no estado do Amazonas, Brasil .....	114
<b>Tabela 11</b> – Coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre níveis de anticorpos inibitórios e níveis de anticorpos naturalmente adquiridos contra variantes de <i>Duffy binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i> em indivíduos do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil .....	116
<b>Tabela 12</b> – Associação entre atividade de inibição de ligação de anticorpos naturalmente adquiridos para PvDBP e risco prospectivo de malária vivax clínica nos indivíduos do estudo .....	121
<b>Tabela 13</b> – Capacidade de inibição da interação entre nDARC-Fc e PvDBP Sal I dos indivíduos com células sanguíneas mononucleares periféricas coletadas .....	122
<b>Tabela 14</b> – Regiões variáveis do anticorpo monoclonal brasileiro expresso (134/135) específico para PvDBP Sal I .....	125
<b>Tabela 15</b> – Proporção de amostras de plasma de indivíduos do assentamento rural no estado do Amazonas, Brasil, que competem $\geq 80\%$ pelo o mesmo sítio de ligação em PvDBP com o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135 .....	127
<b>Tabela 16</b> – Parasitemia do ensaio de inibição de invasão de <i>Plasmodium vivax</i> em reticulócitos humanos .....	136

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	–	Adenina
aa	–	Aminoácido
ABRA	–	<i>Acid- basic repetitive antigen</i>
ACD	–	Ácido cítrico citrato e dextrose
Ala	–	Alanina
AMA – 1	–	Antígeno 1 de Membrana Apical (do inglês <i>Apical Membrane Antigen 1</i> )
Asp	–	Ácido aspártico
BSG	–	Basigina
C	–	Citosina
CDC	–	<i>Center for Disease control and prevention</i>
CD71	–	Receptor de transferrina
CD234	–	Receptor DARC
cDNA	–	DNA complementar
Cys	–	Cisteína
DARC	–	Antígeno Duffy receptor de quimiocinas (do inglês <i>Duffy Antigen Receptor for chemokines</i> )
DBL	–	<i>Duffy binding-like proteins/ligand</i>
DBP	–	<i>Duffy binding protein</i>
DDT	–	Diclorodifeniltricloroetano
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	–	desoribonucleico trifosfatado
EBA	–	<i>Antigen binding erythrocyte</i>
EBL	–	<i>Erythrocyte binding-like/ ligand</i>
EDTA	–	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ES	–	Eritrócito silencioso (do inglês <i>Erythrocyte silent</i> )
Fy	–	Grupo sanguíneo Duffy
G	–	Guanina
Gly	–	Glicina
GP- FY	–	Glicoproteína do grupo sanguíneo Duffy
HA	–	Hemaglutinina
IC	–	Intervalo de confiança
ICB	–	Instituto de Ciências Biomédicas
Ig	–	Imunoglobulina
IQ	–	Intervalo interquartil
IR	–	Índice de reatividade
LB	–	Meio Lúria-Bertani
MFI	–	Mediana de intensidade de fluorescência
MSP	–	Proteína de superfície de merozoíto (do inglês <i>Merozoite surface protein</i> )
OMS	–	Organização mundial da saúde
OPS	–	Organização Pan-Americana de Saúde
pb	–	pares de bases
PBS	–	Solução salina tamponada
PBMC	–	Célula mononuclear de sangue periférico (do inglês, <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> )

PBS-T	–	Solução de salina tamponada com 0,05% de <i>Tween</i>
PBS-TBN	–	Solução salina tamponada com <i>Tween</i> e azida sódica
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PEI	–	Polietilenimina
PfEBA	–	<i>Antigen binding erythrocyte</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>
PfRh	–	<i>Plasmodium falciparum</i> reticulocyte binding protein-like homologues
PNG	–	Papua Nova Guiné
PvDBP	–	<i>Duffy binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>
PvDBPII	–	Região II de <i>Duffy binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>
PvRBP	–	<i>Reticulocyte binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>
qPCR	–	PCR quantitativo em tempo real (do inglês, <i>Real Time quantitative PCR</i> )
RBLs	–	<i>Reticulocyte binding-like</i>
RBS	–	<i>Receptor binding site</i>
RHs	–	<i>Reticulocyte protein binding homologue</i>
Sal I	–	Salvador I
scFv	–	Fragmento variável de cadeia única (do inglês, <i>single-chain fragments of variable fragment</i> )
SD	–	Subdomínio de PvDBP (1, 2 ou 3)
T	–	Timina
TM	–	Domínio transmembrana
WHO	–	<i>World Healthy Organization</i>

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	–	Grau Celsius
g	–	Grama
<i>g</i>	–	Gravidade
h	–	horas
Kb	–	Quilobase
km	–	Quilômetro
M	–	Molaridade
mg	–	Micrograma
Ng	–	Nanograma
ng/μL	–	Nanograma por microlitro
μg	–	Micrograma
μg/MI	–	Micrograma por mililitro
μL	–	Microlitro
μm	–	Micrômetro
μM	–	Micro molar
ρ	–	Coeficiente de correlação de Spearman
≥	–	Maior ou igual
≤	–	Menor ou igual
χ <sup>2</sup>	–	Qui-quadrado

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	22
<b>1.1 Malária, um problema de saúde pública global .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2 Malária no Brasil .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Patogenia da doença .....</b>	<b>26</b>
<b>1.4 Ciclo do parasita .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Imunidade naturalmente adquirida à malária .....</b>	<b>31</b>
<b>1.6 Grupo sanguíneo Duffy (DARC) e sua relevância para infecções causadas por Plasmodium vivax .....</b>	<b>31</b>
<b>1.7 Processo de invasão eritrocitária por parasitas do gênero Plasmodium .....</b>	<b>37</b>
<i>1.7.1 Moléculas envolvidas no processo de invasão .....</i>	<i>41</i>
<u>1.7.1.1 PvRBPs .....</u>	<u>41</u>
<u>1.7.1.2 MSP-1<sub>19</sub> (Fragmento 19 da Proteína 1 da superfície do merozoíto) .....</u>	<u>43</u>
<u>1.7.1.3 MSP-3 (Proteína 3 da superfície do merozoíto) .....</u>	<u>46</u>
<u>1.7.1.4 MSP-9 (Proteína 9 da superfície do merozoíto) .....</u>	<u>49</u>
<u>1.7.1.5 AMA- 1 (Antígeno 1 de Membrana Apical) .....</u>	<u>51</u>
<u>1.7.1.6 PvDBP (Duffy binding protein de Plasmodium vivax) .....</u>	<u>54</u>
<b>1.8 Anticorpos monoclonais recombinantes humanos anti-PvDBP .....</b>	<b>62</b>
2 OBJETIVOS .....	64
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	65
<b>3.1 Delineamento do estudo .....</b>	<b>65</b>
<i>3.1.1 Área de estudo e inquéritos transversais .....</i>	<i>65</i>
<i>3.1.2 Diagnóstico de malária e vigilância .....</i>	<i>66</i>
<i>3.1.3 Genotipagem DARC .....</i>	<i>67</i>
<b>3.2 Antígenos recombinantes .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3 Conjugação das microesferas para ensaio sorológico .....</b>	<b>69</b>
<b>3.4 Ensaio multiplex baseado em microesferas para detecção de anticorpos .....</b>	<b>70</b>
<b>3.5 Sequenciamento da região II de PvDBP .....</b>	<b>71</b>
<b>3.6 Ensaio de inibição de ligação baseado em microplaca .....</b>	<b>72</b>
<b>3.7 Coleta das células monucleares periféricas .....</b>	<b>74</b>

3.7.1 Processamento das células sanguíneas mononucleares periféricas .....	75
<b>3.8 Produção de anticorpos monoclonais anti-PvDBP .....</b>	<b>76</b>
3.8.1 FACS sorting de células B específicas .....	76
3.8.2 Síntese de DNA complementar das células B .....	79
3.8.3 Amplificação das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas .....	80
3.8.4 Digestão, ligação e transformação em células competentes .....	85
3.8.5 Produção de Anticorpos Monoclonais em pequeno volume .....	88
3.8.6 ELISA para detecção de Imuglobulinas IgG .....	88
3.8.7 ELISA para detecção de anticorpos anti-PvDBP .....	89
3.8.8 Produção de Anticorpos Monoclonais em grande volume .....	89
<b>3.9 Caracterização do anticorpo monoclonal anti-PvDBP humano .....</b>	<b>90</b>
3.9.1 Ensaio de inibição de ligação in vitro .....	90
3.9.2 ELISA de competição por sítio de ligação .....	91
3.9.3 Ensaio de inibição de invasão ex-vivo .....	94
<u>3.9.3.1 Enriquecimento de reticulócitos .....</u>	<u>94</u>
<u>3.9.3.2 Ensaio de invasão ex-vivo .....</u>	<u>95</u>
<u>3.9.3.2.1 Descongelamento de parasitos .....</u>	<u>95</u>
<u>3.9.3.2.2 Maturação dos parasitos e Ensaio de invasão .....</u>	<u>96</u>
<b>3.10 Análise estatística .....</b>	<b>97</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
<b>4.1 Anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra PvDBP e outros antígenos .....</b>	<b>99</b>
<b>4.2 Diversidade de sequência e reconhecimento de anticorpos para variantes de PvDBP .....</b>	<b>101</b>
<b>4.3 Prevalência de malária e níveis de anticorpos ao longo do tempo .....</b>	<b>103</b>
<b>4.4 Incidência de infecções por <i>Plasmodium vivax</i> na área de estudo .....</b>	<b>110</b>
<b>4.5 Níveis de anticorpos e parasitemia em episódio de malária vivax .....</b>	<b>111</b>
<b>4.6 Risco prospectivo de malária clínica causada por <i>Plasmodium vivax</i> .....</b>	<b>111</b>
<b>4.7 Anticorpos de inibição de ligação naturalmente adquiridos .....</b>	<b>114</b>
<b>4.8 Reatividade variante-específica de anticorpos de inibição de ligação naturalmente adquiridos .....</b>	<b>117</b>
<b>4.9 Anticorpos de inibição de ligação e risco prospectivo de malária vivax .....</b>	<b>120</b>
<b>4.10 Produção de monoclonais recombinantes específicos para PvDBPII .....</b>	<b>122</b>

4.10.1 <i>Sorting de células B de memória antígeno-específicas</i> .....	122
4.10. 2 <i>Obtenção do anticorpo monoclonal anti-PvDBP Sal I</i> .....	124
4.10.3 <i>Anticorpo monoclonal brasileiro e seu pontencial de inibir a ligação entre PvDBPII Sal I e hemácias de diferentes genótipos DARC</i> .....	126
4.10.4 <i>Competição por sítio de ligação em PvDBP entre anticorpo monoclonal expresso e anticorpos inibitórios naturalmente adquiridos</i> .....	127
4.10.5 <i>Anticorpo monoclonal anti-PvDBP e ensaios de inibição de invasão ex-vivo</i> .....	132
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>137</b>
<b>5.1 Anticorpos anti-PvDBP naturalmente adquiridos</b> .....	<b>137</b>
<b>5.2 Prevalência de anticorpos anti-PvDBP de acordo com a idade</b> .....	<b>138</b>
<b>5.3 Diversidade de sequência e anticorpos anti-PvDBP cepa – transcendentales</b> .....	<b>139</b>
<b>5.4 Níveis de anticorpos anti-PvDBP naturalmente adquiridos durante o estudo e proteção contra malária vivax clínica</b> .....	<b>141</b>
<b>5.5 Resposta de anticorpos contra antígenos PvMSPs e EBA-175</b> .....	<b>143</b>
<b>5.6 Anticorpos inibitórios anti-PvDBP</b> .....	<b>144</b>
5.6.1 <i>Anticorpos inibitórios cepa-transcendentales</i> .....	146
5.6.2 <i>Presença de anticorpos inibitórios e proteção para infecção por Plasmodium vivax</i> .....	148
<b>5.7 Anticorpo monoclonal anti-PvDBPII Sal I</b> .....	<b>149</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>155</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>156</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>178</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Malária, um problema de saúde pública global

Causada por parasitas do filo Apicomplexa e do gênero *Plasmodium*, no ano de 2016 a malária foi considerada endêmica em 91 países e territórios de cinco continentes. Mesmo com progressos em relação à queda na incidência da doença (houve uma redução de 41% entre os anos 2000-2015), provavelmente devido à implantação em larga escala de intervenções de controle, estimativas atualizadas indicam que 212 milhões de casos ocorreram no mundo no ano 2015, levando a 429.000 mortes, a maioria de crianças menores de 5 anos na África (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2016).

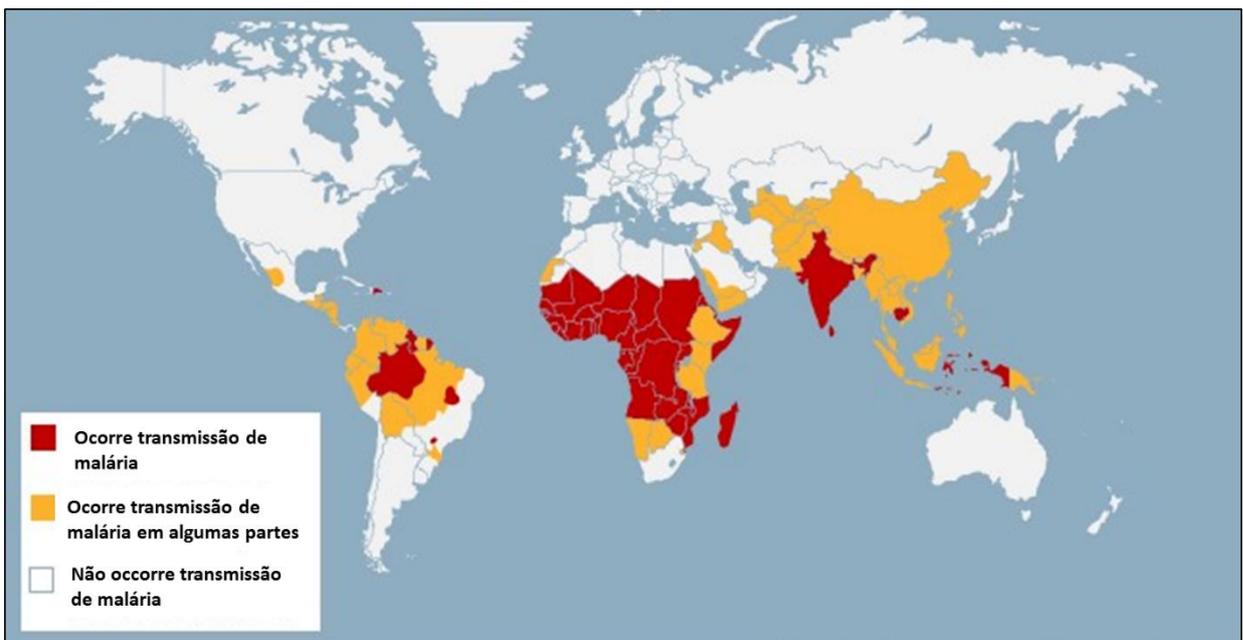
Existem cinco espécies de parasitas que causam malária em humanos: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, sendo as duas últimas as que apresentam maior morbidade em termos globais. *Plasmodium falciparum* é o parasita mais prevalente na África e responsável pela maioria das mortes relacionadas à doença no mundo (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO), 2015).

Em 2015, 90% dos casos de malária registrados em todo o mundo foram no continente africano, seguido de 7% na Ásia e 2% na região do Mediterrâneo Oriental. Somente cerca de 4% dos casos globais são causados por *P. vivax*, mas fora do continente africano essa proporção aumenta para 41%. *Plasmodium vivax* ocorre em uma área geográfica mais ampla, estendendo-se muito além dos limites de *P. falciparum*, em climas temperados (Figura 1). Isso é possível pela presença de parasitas intracelulares inativos no fígado (hipnozoítos), tornando este órgão um abrigo seguro ao ataque do sistema imunológico durante as estações mais frias, quando a transmissão e a propagação não são possíveis. A maioria dos casos de malária causados por essa espécie ocorre no Sul e Sudeste Asiático (58%), seguido do Mediterrâneo Oriental (16%) e África (12%), em países como Sudão, Somália, Etiópia, Quênia, Tanzânia, Madagascar e Mauritània (Figura 1). A Etiópia, Índia, Indonésia e Paquistão contribuem juntos com 78% dos casos de *P. vivax* registrados (HOWES et al., 2016; WHO, 2016).

Mosquitos do gênero *Anopheles* são os principais responsáveis pela transmissão da malária em seres humanos. Das 430 espécies que podem ser encontradas espalhadas pelo

mundo (exceto na Antártida), cerca de 35 delas são conhecidos vetores para malária. No Brasil, responsáveis pela transmissão da doença são as fêmeas de *Anopheles darlingi*, *Anopheles albitarsis* e *Anopheles aquasalis* (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2015; WHO, 2016).

**Figura 1** – Distribuição geográfica da transmissão de malária no mundo.



Fonte: CDC, 2015

Nas Américas, no ano de 2015, 132 milhões de pessoas viviam sob risco da doença; dessas, 21 milhões em áreas de alto risco. A incidência de casos de malária diminuiu 31% entre 2010 e 2015, junto com a taxa de mortalidade, que reduziu 37% nesse mesmo período. Em 2015, a Venezuela apresentou maior número de casos (30% do total das Americas), seguido do Brasil (24%) e Peru (19%). Colômbia, Haiti e Guiana Francesa somaram 10%, 9% e 3% do total de casos registrados, respectivamente. Nos últimos anos, Peru e Venezuela vêm experimentando um aumento no número de casos registrados. Na região de Loreto, na Amazônia peruana, a incidência de malária triplicou entre 2011 e 2013, com mais de 60 mil casos registrados em 2014. Na Venezuela, o número de casos em 2016 foi 75% maior em relação a 2015 (RECHT et al., 2017; WHO, 2016).

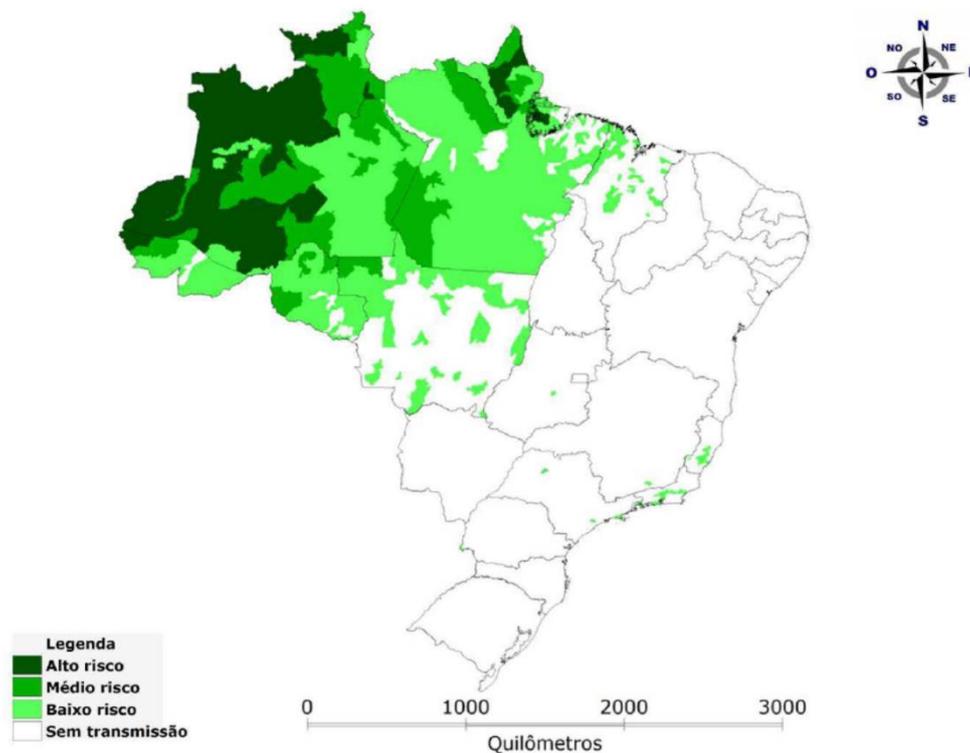
Entre 2013 e 2015, *P. falciparum* foi responsável por quase 100% das infecções no Haiti e República Dominicana e aproximadamente 50% na Colômbia e Guiana Francesa. Já em El

Salvador, Belize e México, quase 100% dos casos de malária registrados foram causados por *P. vivax* (WHO, 2016).

## 1.2 Malária no Brasil

No Brasil, em 2015, foram registrados 143.049 casos de malária. *Plasmodium vivax* foi responsável por 88% desses números, enquanto que *P. falciparum*, 12%. Nesse país, a malária é altamente prevalente na Amazônia Legal (Figura 2). Cerca de 99,8% dos registros da doença são oriundos da Bacia Amazônica, porém apenas 13% da população do país vive nessa região. Nos anos de 2013-2014, os quinze principais municípios da região registram juntos 57,3% do total de casos de malária no país, sendo a cidade de Cruzeiro do Sul, no estado do Acre, a que teve o maior número de casos (PAHO, 2014; WHO, 2016).

**Figura 2** – Distribuição de casos de malária no Brasil, no ano de 2015.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015.

De acordo com Siqueira et al. (2016), no ano de 1999 ocorreram mais de 600 mil casos de malária no Brasil. A partir daí, o país começou registrar uma queda na incidência da doença e em 2015 foi registrado o menor número de casos no país dos últimos 35 anos. Essa

diminuição provavelmente resultou de esforços de controle implementados, baseados no diagnóstico e tratamento rápidos e adequados dos infectados em um grande número de postos de atendimento espalhados pela Amazônia, bem como na borrifação intradomiciliar de inseticidas. No entanto, a transmissão de malária ainda ocorre na região, com aumentos registrados em 1999 e 2005. Uma variedade de fatores pode ter corroborado para tanto, como a falta de condições sanitárias adequadas e cenários socioeconômicos e políticos instáveis (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2016).

O principal vetor responsável pela transmissão da doença na Amazônia brasileira é *Anopheles darlingi*. No país, para controle desse vetor são empregados o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas e borrifação intradomiciliar com inseticidas, visando a evitar o contato homem-vetor e diminuir a incidência de malária. Contudo, ainda não há dados sobre o impacto que essas medidas têm na supressão de populações de anofelinos e na redução dos níveis de transmissão de parasitas da malária na Amazônia (MARTINS-CAMPOS et al., 2012; VITOR-SILVA et al., 2016).

Entre 2010 e 2013, aproximadamente 0,5% dos casos registrados de malária no Brasil foram diagnosticados e tratados na região extra-amazônica. Os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte e do Sul, Santa Catarina, Sergipe, São Paulo e partes do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso, fazem parte dos 40,25% do território brasileiro que eventualmente apresentam registros de malária extra-amazônica. Alguns desses casos são chamados autóctones (têm origem no local onde existe uma fonte de infecção, podendo ser uma zoonose, envolvendo reservatórios não-humanos e vetores competentes) e podem ocorrer em áreas cobertas por remanescentes da Mata Atlântica. Outros podem ser casos de malária importada de região endêmica brasileira ou do exterior, como as Américas Central e do Sul, ou países da África ou Ásia. Um dos indicadores de diferentes fontes de malária é a alta proporção de malária falciparum: 36% dos casos de malária extra-amazônica registrados em 2013 foram causados por essa espécie (DE PINA-COSTA et al., 2014).

A predominância de *P. vivax* em relação a *P. falciparum* no Brasil teve início no começo dos anos 90 (quando 44,3% dos casos registrados eram causados por *P. falciparum*) diminuindo ao longo da década seguinte até 2009, quando *P. vivax* se tornou a espécie mais prevalente (nesse ano apenas 16,3% dos casos eram de malária falciparum) (OLIVEIRA-

FERREIRA et al., 2010). Tal fato pode ser explicado devido a diferenças de características biológicas das duas espécies, como densidades parasitárias mais baixas para *P. vivax*, que podem não ser detectadas e conseqüentemente não tratadas, resultando em fontes de transmissão constante para mosquitos, além de circulação precoce de estágios sexuais dessa espécie no sangue (os gametócitos). Outra importante característica é presença de hipnozoítos em *P. vivax* (formas hepáticas dormentes que somente são erradicadas com o uso de primaquina), permitindo que ocorram os relapsos e a imunidade natural contra essa espécie ser adquirida mais precocemente do que para *P. falciparum* (RECHT et al., 2017).

### 1.3 Patogenia da doença

Dependendo da espécie de *Plasmodium*, a infecção pode manifestar-se como uma doença não-complicada, evoluindo ou não, para a forma complicada. Globalmente, *P. falciparum* é o parasita responsável pela maioria das doenças febris não-complicadas, bem como malária grave e fatal. Dentre essas, destacam-se quadros de malária cerebral, anemia grave e acidose metabólica (MILLER et al., 2002), por este motivo, acaba ofuscando a importância clínica e de saúde pública da malária causada por *P. vivax*, onde predomina a forma não complicada caracterizada por febre intermitente, intensa debilidade física, entre outros sintomas. Hoje, no entanto, é reconhecida a capacidade de *P. vivax* produzir doença grave, eventualmente fatal e adquirir resistência a diversos antimaláricos de uso corrente, especialmente a cloroquina (PRICE et al., 2009). *Plasmodium knowlesi* também já foi associado com malária grave e fatal (COX- SINGH et al., 2010).

No Brasil, a autópsia de 13 de 17 pacientes com diagnóstico clínico de malária revelou que *P. vivax* foi a causa direta da morte ou contribuiu consideravelmente para a descompensação de uma condição pré-existente, levando ao óbito. Os sintomas clínicos mais comuns diagnosticados antes da morte foram: insuficiência respiratória, icterícia, insuficiência renal aguda, anemia grave e coma (LACERDA et al., 2012). Foram registrados também casos de miocardite relacionado a infecção por *P. vivax* em um indivíduo do Pará (VENTURA et al., 2014).

Em comparação realizada por Siqueira et al. (2015) das características clínicas para malária vivax complicada entre pacientes da Índia e Brasil, o sintoma mais comum registrado nos dois países foi anemia, seguido de insuficiência renal. Falta de ar, hiperlactatemia,

hipoglicemia e coagulação intravascular disseminada, embora raros, foram observados em pacientes de Manaus. Malária cerebral foi um sintoma grave encontrado com maior frequência em pacientes indianos. De acordo com os autores, o desenvolvimento de sintomas graves parece ser mais frequente em mulheres, mulheres grávidas e indivíduos que apresentam infecção primária, bem com aqueles com co-morbidades agudas ou crônicas.

#### 1.4 Ciclo do parasita

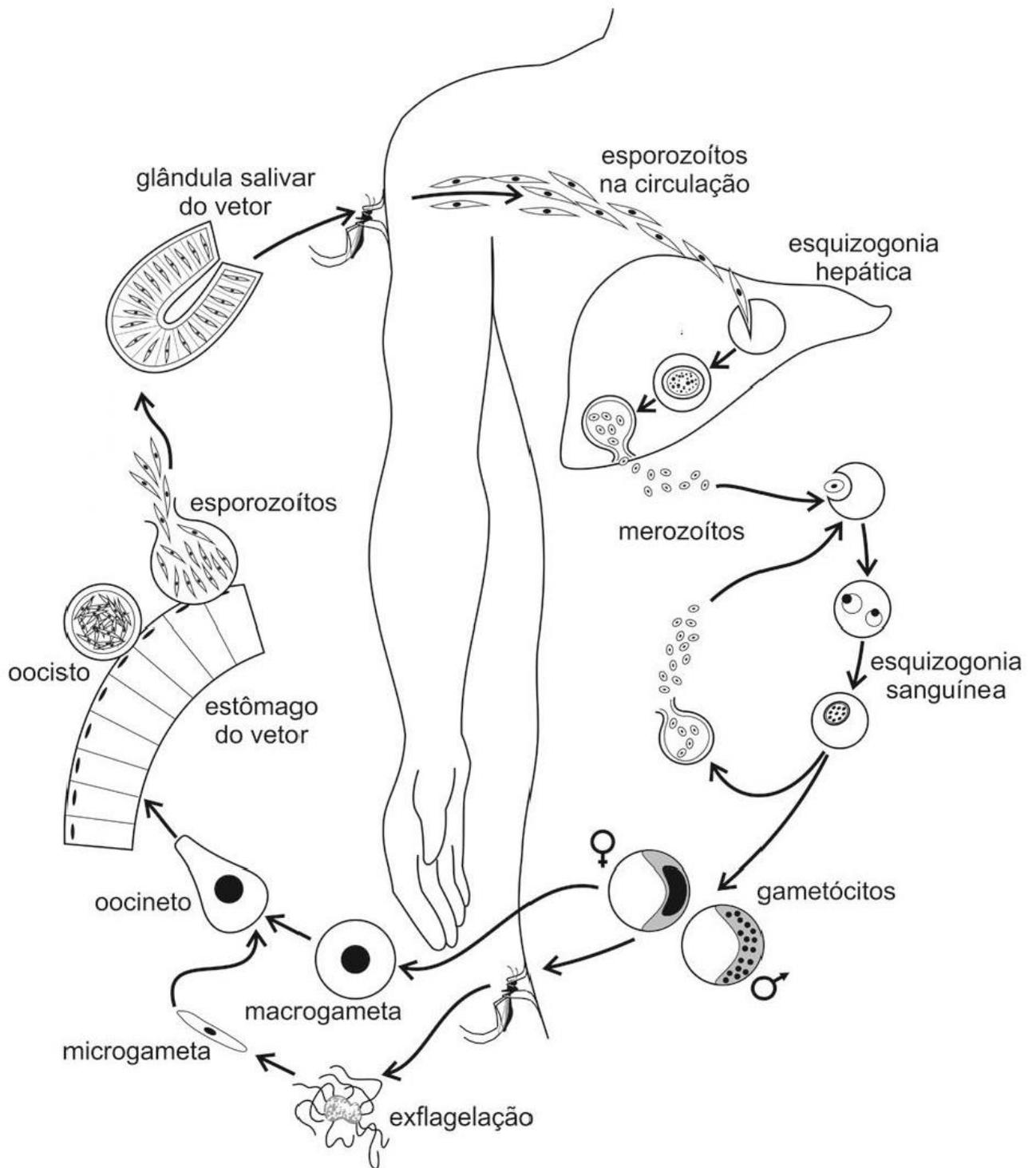
O ciclo biológico dos parasitas da malária humana compreende duas fases: uma delas é sexuada, que ocorre nas fêmeas do gênero *Anopheles* e a outra assexuada, no hospedeiro vertebrado (Figura 3). As fêmeas de anofelinos inoculam no hospedeiro vertebrado, durante seu repasto sanguíneo, formas infectantes do parasita conhecidas como esporozoítos. Esses esporozoítos migram pela corrente sanguínea e invadem hepatócitos no fígado. Após a invasão, os esporozoítos se multiplicam por reprodução assexuada (esquizogonia) gerando merozoítos hepáticos. O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para *P. malarie*. A liberação dos merozoítos hepáticos para a circulação dá-se por meio da ruptura de uma vesícula que os envolve, conhecida como merossomo. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos originam os hipnozoítos (formas dormentes intra-hepáticas), responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação: de 1 mês a 2 anos (KROTOSKI, 1985). O indivíduo infectado com essas formas latentes poderá apresentar manifestações clínicas da doença posteriormente ao tratamento, mesmo que não tenham um novo contato com o agente transmissor.

Os merozoítos invadem exclusivamente hemácias. O processo de invasão aos eritrócitos é complexo, dependendo de várias interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores presentes na superfície da célula hospedeira (GAUR; MAYER; MILLER, 2004). Os merozoítos, após invadirem os eritrócitos, se diferenciam em trofozoítos jovens, posteriormente em trofozoítos maduros, que realizam nova esquizogonia e originam esquizontes multinucleados, dos quais se liberam novos merozoítos capazes de infectar outros eritrócitos. A fase sanguínea do ciclo é responsável pelas manifestações clínicas da doença, pois a liberação dos merozoítos em corrente sanguínea coincide com os picos febris periódicos característicos da malária. Alguns parasitos se diferenciam em estágios sexuais,

conhecidos como gametócitos (masculino e feminino). Ao serem ingeridos durante um novo repasto sanguíneo por fêmeas do *Anopheles*, dão continuidade ao ciclo do parasita com a formação dos gametas.

A próxima fase do ciclo, chamada esporogonia, ocorre no mosquito. Os gametócitos ingeridos pela fêmea do *Anopheles*, não são digeridos no estômago dos insetos. Em poucos minutos, o gametócito masculino sofre exflagelação, resultando na formação de 6 a 8 gametas masculinos ou microgametas, enquanto que os gametócitos femininos transformam-se em macrogametas. O zigoto formado pela fusão de microgametas e macrogametas transforma-se em poucas horas em um estágio móvel chamado oocineto. Após atravessar a parede intestinal do mosquito, o oocineto aloja-se na membrana basal, onde se torna um oocisto. No interior dos oocistos ocorrem diferenciações e divisões nucleares que objetivam a produção dos esporozoítos. Com a ruptura do oocisto, milhares de esporozoítos são liberados e migram para as glândulas salivares do mosquito. A cada repasto sanguíneo, dezenas de esporozoítos são inoculados no hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo. O ciclo esporogônico no mosquito dura aproximadamente 14 dias (MATUSCHEWSKI, 2006).

**Figura 3** – Ciclo de vida dos plasmódios que infectam o homem. Neste ciclo não estão representados os hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*. As etapas de desenvolvimento do parasita no vetor estão simplificadas.



**Fonte:** Ferreira (2012).

### 1.5 Imunidade naturalmente adquirida à malária

Após repetidas exposições à malária, indivíduos podem desenvolver imunidade efetiva que controla a parasitemia e previne possíveis complicações graves e fatais (BEENSON et al., 2008). Levantamentos epidemiológicos indicam que moradores de áreas endêmicas (com altas taxas de transmissibilidade para as duas espécies), desenvolvem imunidade natural para manifestações clínicas mais rapidamente para *P. vivax* do que para *P. falciparum* (LONGLEY; SATTABONGKOT; MUELLER, 2016).

Estudos com crianças de Papua Nova Guiné (área altamente endêmica para *P. vivax* e *P. falciparum*) revelam que infecções causadas por *P. vivax* predominam até os 2 anos de idade, quando a incidência de doença causada por essa espécie começa a diminuir e *P. falciparum* aumentar. Em torno dos 5 anos, a maioria das crianças desse país adquirem imunidade clínica para *P. vivax*, porém permanecem em considerável risco de infecção para *P. falciparum*. Também foi observada uma queda na incidência de malária vivax complicada, de acordo com o aumento da idade (LIN et al., 2010; MICHON et al., 2007). A rápida aquisição de imunidade contra essa espécie pode ser explicada pelo número de diferentes clones de *P. vivax* que infectam essas crianças na primeira infância. Como essa espécie tem capacidade de manter hipnozoítos e gerar infecções tardias, em regiões de alta transmissão, os parasitos que causam as recaídas podem ser geneticamente diferentes daqueles detectados na infecção sanguínea primária. Como essas crianças estão continuamente expostas, um grande número de diferentes clones de *P. vivax* as infectam e contribuem substancialmente para uma rápida aquisição de imunidade contra malária vivax clínica (KOEPLI et al., 2013) em relação a malária causada por *P. falciparum*.

Segundo Fowkes, Boeuf e Beeson (2016), malária sintomática é tipicamente incomum em crianças mais velhas e adultos, em populações expostas a níveis estáveis de transmissão de média a alta intensidade, além de serem raros os episódios de malária grave. Casos de malária grave são restritos a crianças pequenas (abaixo de 5 anos), em locais de alta transmissão, enquanto que em áreas de baixa transmissão e instáveis, a frequência à exposição pode ser baixa demais para resultar em uma imunidade efetiva, de forma que adultos podem permanecer sob o risco de infecções sintomáticas e malária grave. Ainda de acordo com os autores, nessas regiões de baixa transmissão é necessária uma extensa exposição de infecção estágio-sanguínea, com dezenas de episódios ou persistência de

infecções com baixa parasitemia para o desenvolvimento de imunidade efetivamente protetora.

No Brasil, existe evidência de aquisição de imunidade clínica após anos de exposição ao parasito, tanto em populações nativas da Amazônia (ALVES et al., 2002; LADEIA- ANDRADE et al., 2009) como em comunidades rurais predominantemente compostas por migrantes de áreas não-endêmicas (DA SILVA-NUNES et al., 2008), embora os níveis de transmissão de malária sejam substancialmente inferiores aos observados na África ou Papua Nova Guiné. Indivíduos jovens são mais vulneráveis a infecções sintomáticas; há uma forte correlação positiva entre o tempo vivido em região amazônica e a proporção de infecções maláricas que permanecem assintomáticas (ALVES et al., 2002).

#### **1.6 Grupo sanguíneo Duffy (DARC) e sua relevância para infecções causadas por *Plasmodium vivax***

Descrito há cerca de 60 anos, em um paciente hemofílico politransfundido que deu nome ao sistema, o grupo sanguíneo Duffy, também conhecido como DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokine*) ou CD234, tem despertado interesse em diversos campos da antropologia, genética e malariologia (HOWES et al., 2011).

Os antígenos desse sistema são glicoproteínas transmembrana, localizadas na superfície dos eritrócitos, que funcionam como receptores para citocinas pró-inflamatórias secretadas pelo sistema imune, denominadas quimiocinas. A maioria dos receptores liga-se especificamente a quimiocinas de uma única classe: CC ou CXC. Entretanto, DARC é capaz de ligar-se as essas duas classes e especialmente CXCL8 (interleucina [IL]-8) no plasma, a fim de maximizar a sensibilidade dos neutrófilos circulantes. No geral, acredita-se que DARC atua como um eliminador, reduzindo quantidades excessivas de quimiocinas tóxicas produzidas em algumas condições patológicas. Na malária, o antígeno Duffy é utilizado como receptor para a invasão de hemácias por merozoítos de *P. vivax* e *P. knowlesi* (HADLEY; PIEPER, 1997; MILLER et al., 1976; MURPHY, 1994, NTUMNGIA et al., 2016).

A glicoproteína Duffy é expressa em diversos tecidos não-eritróides, como o rim, baço, coração, pulmão, músculo, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide e células de Purkinje do cerebelo (HADLEY; PIEPER, 1997; HESSELGESSER; HOURUK, 1999). Sabe-se que DARC não é essencial para a estrutura e função normal dos eritrócitos, uma vez

que hemácias sem essa glicoproteína não apresentam alterações funcionais em indivíduos com fenótipo DARC-negativo (CHAUDHURI et al., 1995).

O gene que codifica o grupo sanguíneo Duffy, denominado ACKR1 ou *FY*, se localiza no cromossomo número 1 (DONAHUE et al., 1968), na região 1q22-1q23 (CHAUDHURI et al., 1993). Seu produto (*FY*) é uma glicoproteína (GP-*FY*) de 35 a 43 kDa (HADLEY; PIEPER, 1997) com 336 aminoácidos, e sete hélices hidrofóbicas, com uma topologia na qual existe um domínio amino-terminal extracelular (com 60 aminoácidos), três alças extracelulares, três alças citoplasmáticas e um domínio carbóxi-terminal citoplasmático; ou seja, a glicoproteína Duffy apresenta sete passagens transmembrana (NEOTE et al., 1994).

O sistema Duffy humano apresenta quatro alelos principais: *FY*\*A, *FY*\*B, *FY* (*FY*\*B-33, *FY*\*B nulo ou *FY*\*B<sup>ES</sup> [ES= eritrócito silencioso]) e *FY*\*X (ou *FY*\*b<sup>fraco</sup>), que expressam os respectivos antígenos: *Fy*<sup>a</sup>, *Fy*<sup>b</sup>, *Fy* e uma pequena quantidade de *Fyb* (*Fyb*<sup>fraco</sup>). Portanto, os seres humanos podem apresentar as seguintes combinações de alelos: *Fy*<sup>a</sup>*Fy*<sup>a</sup>, *Fy*<sup>b</sup>*Fy*<sup>b</sup> (homozigotos), *Fy*<sup>a</sup>*Fy*, *Fy*<sup>b</sup>*Fy* (heterozigotos com um único alelo expresso), *Fy*<sup>a</sup>*Fy*<sup>b</sup> (heterozigotos com dois alelos expressos), *FyFy* (Duffy negativos) ou ainda diferentes combinações com *Fyb*<sup>fraco</sup>.

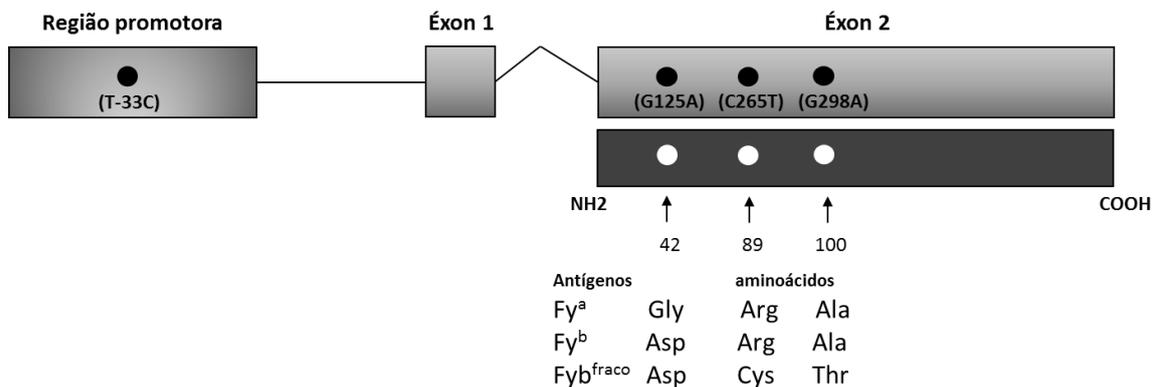
O polimorfismo dos alelos *FY*\*A e *FY*\*B é gerado a partir de uma simples substituição de bases no nucleotídeo 125 (no éxon 2), gerando uma troca de aminoácidos, no códon 42, na região N-terminal da proteína (Figura 4). No alelo *FY*\*A, a base presente é guanina (G), resultando em um códon para glicina; no alelo *FY*\*B, a base é adenina (A), originando um códon para ácido aspártico (JENS; PAGLIARINI; NOVARETTI, 2005). O segundo polimorfismo mais conhecido é uma mutação pontual na região -33, a partir da transição de nucleotídeos T → C, na região promotora do alelo *FY*\*B. Essa alteração leva a uma interrupção no fator de transcrição eritrocitário GATA-1, abolindo a expressão do antígeno *Fy*<sup>b</sup> apenas no eritrócito, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos (TOURNAMILLE et al., 1995). Essa mutação é representada pelos alelos *FY*\*B-33, *FY*\*B<sup>nulo</sup> ou *FY*\*B<sup>ES</sup>.

A fraca expressão do alelo *FY*\*B, conhecida como *FY*\*X, é devida a mutação específica no nucleotídeo 265 C → T desse alelo, ocasionando uma mudança do aminoácido arginina pela cisteína na posição 89 da proteína, responsável pela baixa expressão de fenótipo *Fy*<sup>b</sup>, o que pode resultar em uma fenotipagem Duffy negativa. Esse alelo resulta em apenas 10% de expressão do antígeno na superfície das hemácias em relação a *FY*\*A e *FY*\*B e pode estar associada a outra mutação também no éxon 2, no nucleotídeo 298 G → A, que resulta na troca

do aminoácido alanina por treonina na posição 100 da proteína. Essa última mutação quando ocorre sozinha, não resulta em uma baixa expressão de  $FY^*B$  (OLSSON et al, 1998; TOURNAMILLE et al., 1998). Outra mutação relacionada a fraca expressão de  $FY^*B$ , acontece na posição 145G>T, ocasionando a substituição do aminoácido alanina por serina na posição 49 da proteína (CASTILHO et al., 2004).

A Figura 4 representa esquematicamente o gene  $FY$  do grupo sanguíneo Duffy, bem como os principais polimorfismos que podem estar presentes e as consequentes substituições de aminoácidos.

**Figura 4** – Representação esquemática do gene  $FY$  do grupo sanguíneo Duffy, incluindo a região promotora e os dois éxons.



**Nota:** Os círculos pretos representam as substituições dos nucleotídeos no gene e os brancos, os aminoácidos na proteína. Os números abaixo das setas indicam em que posição da proteína essas trocas ocorrem. Os aminoácidos gerados pela troca ou não de nucleotídeos se encontram abaixo de cada posição. Os aminoácidos encontrados nessas posições determinam o antígeno DARC a ser expresso.

**Fonte:** Modificado de Cavasini et al. (2001).

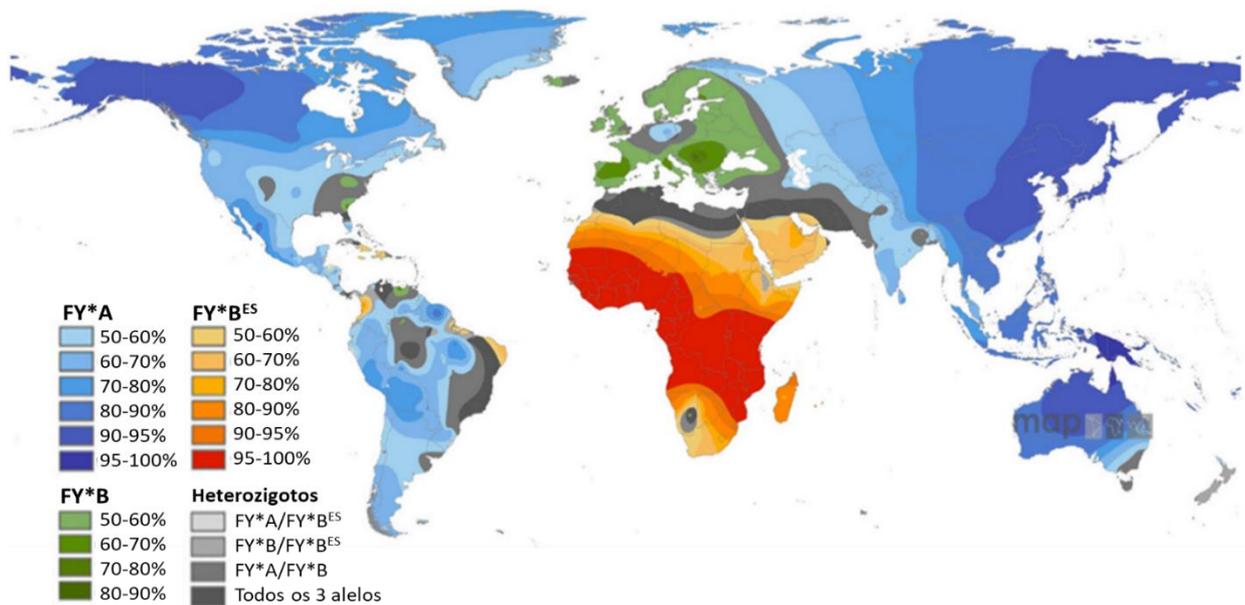
Zimmerman et al. (1999) descreveram uma nova mutação, envolvendo o genótipo  $FY^*A$ , que semelhantemente ao que ocorre com  $FY^*B^{ES}$ , resulta na interrupção da transcrição do gene  $FY^*A$  e consequentemente abole a expressão do antígeno na superfície das hemácias. Essa mutação também ocorre no nucleotídeo -33 da região promotora do gene  $FY^*A$ , sendo denominada  $FY^*A^{nulo}$ . Além de Papua Nova Guiné, esse alelo também foi observado em tribos africanas, inclusive com a combinação com  $FY^*B^{ES}$  ( $FY^*A^{ES}FY^*B^{ES}$ ) no estudo de Kempnińska-Podhorodecka et al. (2012) e na Tunísia por Sellami et al. (2008).

Foram descritas evidências da presença do alelo  $FY^*A^{fraco}$ , que da mesma forma que  $FY^*B^{fraco}$ , possui uma mutação no nucleotídeo 265 C→T, no éxon 2 de *FY*, porém do alelo  $FY^*A$ , resultando em uma baixa expressão de fenótipo  $Fy^a$  (ARNDT et al., 2015) nas hemácias do indivíduo. Recentemente, Pisacka et al. (2015) descreveram uma outra mutação que ocorre na presença do nucleotídeo C (citosina) na posição -69 da região promotora de  $FY^*A$ , causando seu silenciamento (-69C).

Howes et al. (2011) compilaram dados de 131.187 indivíduos para gerar um mapa global da distribuição dos alelos Duffy utilizando um modelo geoestatístico bayesiano. De acordo com os autores, a frequência dos alelos revelou um claro padrão geográfico. O aspecto mais marcante é a presença do alelo silencioso  $FY^*B^{ES}$  em toda a África Subsaariana, enquanto que os alelos  $FY^*A$  ou  $FY^*B$  na mesma região têm frequência de 0 a 5%. De acordo com McManus et al. (2017), o alelo  $FY^*B^{ES}$  está fixado ou próximo da fixação em populações da África central e oriental, mas é quase ausente na Ásia ou Europa. Em amostras de população da África Subsaariana, a frequência desse alelo é muito alta, com exceção de populações zulu (sul da África), que além da presença de  $FY^*B^{ES}$ , conta também os alelos  $FY^*A$  e  $FY^*B$ . A presença de  $FY^*B^{ES}$  contudo, não se limita apenas a África continental, uma vez que a frequência desse alelo foi de 80% em Madagascar e acima de 50% na Península Arábica. Baixas frequências foram encontradas espalhadas pelas Américas, notavelmente ao longo da costa Atlântica e no Caribe, onde se encontram populações afro-descendentes (Figura 5).

A presença dos três alelos juntos é maior nas Américas, com somente algumas “manchas” de domínio de um único alelo (Figura 5). O alelo  $FY^*A$  é presente no leste da Ásia e permanece com frequência acima de 80% no sul da Ásia, Austrália, em populações da Mongólia e em partes do leste da China e Rússia. Esse alelo também foi encontrado com alta frequência (> 90%) no Alasca e noroeste do Canadá. Fora dessas regiões de alta predominância,  $FY^*A$  é um alelo relativamente comum fora do continente Africano, conforme mostra a Figura 5. O alelo  $FY^*B$  se mostrou o menos prevalente globalmente. Frequências acima de 50% são restritas a Europa e alguns pontos da Américas, notavelmente na costa leste dos Estados Unidos.  $FY^*B$  é prevalente em algumas zonas ao redor de regiões onde  $FY^*B^{ES}$  é predominante, como norte, nordeste e sul da África. O alelo silencioso  $FY^*A^{ES}$  não pode ser retratado espacialmente devido a sua raridade (HOWES et al., 2011).

**Figura 5** – Frequência global de alelos *FY*.



**Nota:** Áreas predominantes por um único alelo (com frequência  $\geq 50\%$ ) são representadas por gradiente de cor (azul para FY\*A, verde para FY\*B e vermelho/amarelo para FY\*B<sup>ES</sup>). Nas escalas de cinza estão áreas onde não há alelo predominante, mas dois ou mais alelos com frequência  $\geq 20\%$ . Áreas de cinza mais claro mostram a presença de alelos heterozigotos com FY\*B<sup>ES</sup> e FY\*A ou FY\*B. Áreas de cinza mais escuro são de ocorrência dos três alelos (correspondendo a áreas de maior diversidade genotípica e fenotípica).

**Fonte:** Zimmerman et al. (2013).

Alguns estudos foram conduzidos relacionando as diferenças nos polimorfismos de Duffy e susceptibilidade à malária. O primeiro foi realizado em 1975, por Miller e colaboradores, que descobriram que eritrócitos do grupo sanguíneo DARC negativo (FY\*B<sup>ES</sup>FY\*B<sup>ES</sup>) eram resistentes à invasão *in vitro* por *P. knowlesi*. Um ano depois, Miller et al. (1976), utilizando voluntários com diferentes genótipos DARC, identificaram que indivíduos FY\*B<sup>ES</sup>FY\*B<sup>ES</sup> eram refratários às infecções causadas por *P. vivax*.

King et al. (2011), analisando 400 amostras de indivíduos que vivem em área endêmica para *P. vivax* na Amazônia brasileira, encontraram que indivíduos com genótipos FY\*AFY\*B<sup>ES</sup> e FY\*AFY\*A possuíam as mais baixas incidências de malária vivax clínica quando comparados com FY\*AFY\*B. Em contrapartida, indivíduos com genótipo FY\*BFY\*B<sup>ES</sup> e FY\*BFY\*B tiveram 220 a 270% a mais de risco de desenvolver doença clínica causada por *P. vivax* quando comparados com FY\*AFY\*B. Nesse levantamento, tais resultados revelaram uma diminuição de susceptibilidade à malária vivax associada com Fy<sup>a</sup> e aumento, de acordo com uma maior expressão de Fy<sup>b</sup>. Nenhuma associação foi encontrada entre genótipo Duffy e *P. falciparum*.

Em estudos com amostras de sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* na Amazônia brasileira, Albuquerque et al. (2010) e Cavasini et al. (2007a) concluíram que a presença do alelo FY\*B<sup>ES</sup> confere vantagem seletiva nessa população, uma vez que portadores desse alelo foram menos infectados por *P. vivax*. Em ambos os estudos, a presença de alelos FY\*B ou FY\*A com FY\*X foram relacionados com baixas parasitemias e alta susceptibilidade à malária foi associada ao genótipo FY\*AFY\*B.

A redução na expressão de DARC também foi associada a proteção contra malária causada por *P. vivax* em indivíduos de Papua Nova Guiné, em um levantamento realizado por Kasehagen et al. (2007). No estudo realizado entre indivíduos com genótipo FY\*AFY\*A e FY\*AFY\*A<sup>nulo</sup> foi evidente a redução no risco de infecção estágio sanguínea por *P. vivax* associado a presença de um alelo FY\*A<sup>nulo</sup>, em relação a FY\*AFY\*A. Em crianças abaixo de 15 anos, a parasitemia foi quatro vezes mais baixa entre FY\*AFY\*A<sup>nulo</sup> do que em FY\*AFY\*A.

Historicamente, a vital necessidade da interação PvDBP-DARC ficou evidente a partir da ausência de infecção por *P. vivax* em populações com alta prevalência de indivíduos DARC negativos, como já mencionado (MILLER et al., 1975; 1976). Por essa razão, durante muito tempo, *P. vivax* foi considerado ausente/raro em regiões africanas onde esse genótipo predomina. No entanto, há relatos de indivíduos Duffy negativos infectados por *P. vivax* em Camarões, onde 95 a 99% da população são Duffy negativos (NGASSA MBENDA; DAS, 2014; NGASSA MBENDA; GOUADO; DAS, 2016; RUSSO et al., 2017). Ainda na África, Duffy negativos com infecções causadas por *P. vivax* foram relatados na Etiópia (LO et al., 2015), Madagascar (MENARD et al., 2010), Mauritânia (WURTZ et al., 2011), Angola e Guiné Equatorial (MENDES et al., 2011).

No Brasil, Carvalho et al. (2012) registraram casos de indivíduos Duffy negativos no Pará infectados por *P. vivax*. Além desses, mais dois já haviam sido encontrados por Cavasini et al. (2007b) em Rondônia. Tais relatos indicam que *P. vivax* pode utilizar vias alternativas de invasão em eritrócitos de indivíduos Duffy negativos. De acordo com Ngassa Mbenda, Gouado e Das (2016) e Ménard et al. (2010), o processo de invasão de *P. vivax* em eritrócitos Duffy negativos parece ser prejudicado em relação à hemácias Duffy positivas, pois nesses indivíduos a prevalência da doença é muito maior. Entretanto, em episódios de malária vivax em indivíduos Duffy negativos não é comum o desenvolvimento de altas parasitemias e doença clínica grave (MÉNARD et al., 2010).

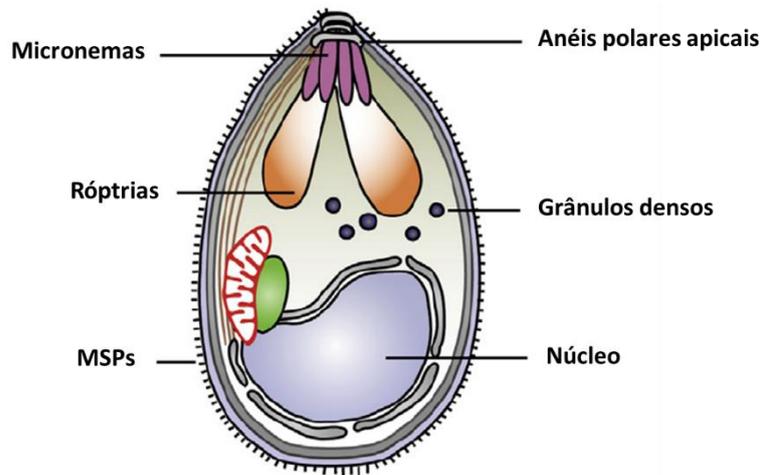
### 1.7 Processo de invasão eritrocitária por parasitas do gênero *Plasmodium*

Merozoítos de *P. falciparum* invadem e se desenvolvem em eritrócitos de todas as idades, enquanto que outras espécies de *Plasmodium* são mais restritas em relação à idade da hemácia hospedeira. *Plasmodium vivax* tem preferência por reticulócitos, que são glóbulos vermelhos jovens que ainda mantêm restos de RNA em seu citoplasma, dificultando seu cultivo *in vitro* em função da baixa disponibilidade e rápida maturação de reticulócitos no sangue periférico. Malleret et al. (2015), utilizando parasitas de paciente em um ensaio *ex-vivo*, demonstraram que a invasão de *P. vivax* é restrita a reticulócitos muito jovens, inclusive ainda expressando o marcador de superfície CD71 - receptor de transferrina (presente em reticulócitos imaturos e progressivamente perdido a medida que os reticulócitos se desenvolvem em normócitos). *Plasmodium knowlesi* também mostra preferência por hemácias jovens, porém o desenvolvimento da cultura estendida dessa espécie com hemácias humanas revelou que os parasitas são capazes de se adaptar e invadir também eritrócitos mais velhos (MOON et al., 2013).

Mesmo com seu tamanho reduzido (1-3  $\mu\text{m}$ ), os merozoítos contêm todas as organelas essenciais para reconhecer e invadir células sanguíneas: as róptrias, grânulos densos e micronemas (Figura 6); estruturas que também estão presentes na porção apical final de parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa. As róptrias são organelas secretórias especializadas que têm a função na invasão das células do hospedeiro e formar a membrana do vacúolo parasitóforo. Os grânulos densos provocam modificações na célula hospedeira durante o processo de invasão e os micronemas, têm função de adesão na hemácia e motilidade (DE NIZ et al., 2017).

Imagens de microscopia eletrônica de merozoítos de *Plasmodium* revelam que sua superfície é coberta por proteínas denominadas MSPs (proteínas de superfície de merozoítos), que parecem ser perdidas durante o processo de invaginação do parasita para interior da hemácia do hospedeiro (Figura 6). Desde sua descoberta, a composição e função dessas proteínas têm sido discutidas devido ao seu papel no processo de invasão eritrocitária; e conseqüentemente, se tornam possíveis candidatos à vacina contra essa doença. Outras proteínas relevantes para o processo de invasão se localizam no interior das róptrias e micronemas, estruturas que podem ser observadas na Figura 6 (BEESON et al., 2016).

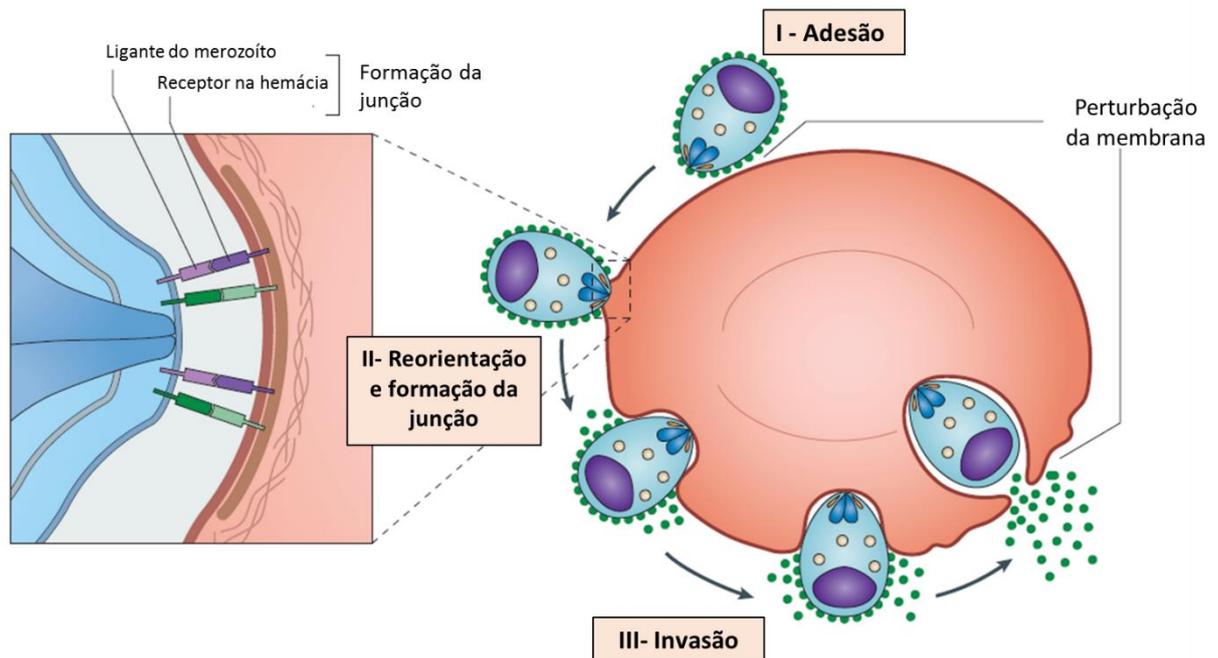
**Figura 6** – Representação esquemática de estruturas e organelas do merozoíto de *Plasmodium*.



**Fonte:** Tham; Beeson; Rayner (2016).

O processo de invasão eritrocitária ocorre em três etapas: I – adesão do parasita ao eritrócito, II – reorientação do parasita, direcionando o pólo apical para a membrana da célula hospedeira e III – formação da junção e invasão. Essas etapas são demonstradas na Figura 7.

**Figura 7** – Representação esquemática do processo de invasão do merozoíto em eritrócitos.



**Fonte:** Adaptado de De Niz et al. (2017)

Resumidamente, após a liberação na corrente sanguínea com a ruptura de uma célula sanguínea infectada, o merozoíto encontra uma nova célula sanguínea e requer apenas de 1 a 2 minutos para completar a re-invasão e estabelecer um novo ciclo intra-eritrocitário. Durante o encontro, merozoíto e a célula sanguínea passam por uma série ordenada de interações adesivas, maioria das quais são mediadas através contato entre receptores da membrana eritrocitária e proteínas do parasita. Um merozoíto livre pode se conectar em qualquer parte da sua superfície em uma célula sanguínea. Durante essa primeira fase do encontro, a adesão é dinâmica, mediada pelas inúmeras MSPs e de baixa afinidade, provocando ondas de deformação na membrana da célula sanguínea a partir do local de contato (etapa I – Adesão, Figura 7). Dentre as proteínas de superfícies, algumas (MSP 1, 2, 4, 5, 8 e 10) se mantêm ancoradas na membrana pela cauda de GPI (glicosilfosfatidilinositol), enquanto outras (MSP 3, 6, 7 e 9) são solúveis e apenas associadas à superfície do merozoíto (COWMAN; CRABB, 2006; PAUL; EGAN; DURASINGH, 2015).

O contato inicial entre o parasita e a membrana da célula sanguínea culmina na reorientação da extremidade apical do merozoíto, onde as organelas secretórias estão localizadas (Fase II, Figura 7). Os mecanismos que promovem essa reorientação ainda não

estão bem elucidados, mas há indícios de que o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) possa ser a proteína chave dessa fase. Após a ligação apical, mas antes da entrada intracelular, o merozoíto cria uma junção que atua como ponto de apoio, formando um anel ao redor do parasita que também demarca o vacúolo parasitóforo da membrana da célula hospedeira. A combinação de várias técnicas modernas de imagem revelaram que essa ligação irreversível do merozoíto à membrana da hemácia é mediada pelas EBLs (*Erythrocyte binding-like proteins/ligands*), RBLs (*Reticulocyte binding-like*) ou RHs (*Reticulocyte protein-binding homologues*). Esses parasitas, ao contrário de agentes infecciosos bacterianos ou virais, são equipados com sua própria força motora de actina-miosina, que não fornece apenas sua motilidade, mas também força mecânica para penetrar ativamente nas células hospedeiras. Esse conservado sistema atua como transportador empurrando o parasita para dentro da célula hospedeira, enquanto interações ligante-receptor acontecem. A invasão é completa quando o vacúolo parasitóforo que irá abrigar o parasita durante seu desenvolvimento e replicação se afasta da membrana e se encontra no interior da hemácia, com posterior selagem da membrana da hemácia do hospedeiro (Fase III, Figura 7). Essa terceira fase ocorre cerca de 10 a 20 segundos depois que o merozoíto invade a hemácia e é caracterizada pela equinocitose da célula sanguínea (formação anormal da membrana celular com múltiplas espículas e projeções) (GILSON; CRABB, 2009; KOCH; BAUM, 2016; PAUL; EGAN; DURAISINGH, 2015).

Como mencionado acima, duas famílias de proteínas de *Plasmodium* estão envolvidas na detecção/seleção da célula hospedeira. A primeira família é composta por proteínas que contém o domínio EBL (*Erythrocyte binding-like*), que é conservado em todo gênero *Plasmodium*. Essas proteínas incluem a *Duffy binding protein* de *P. vivax* (PvDBP), que se liga ao antígeno DARC nas hemácias do hospedeiro e PfEBA- 175, PfEBA- 181 e PfEBL-1, todos antígenos de *P. falciparum* que se ligam a eritrócitos. A segunda família de proteínas é chamada de RBL (*Reticulocyte binding-like*); seus membros incluem a família das PvRBPs (*Reticulocyte binding protein*) e PfRHs (*Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein-like homologues*). Ao contrário das MSPs, que estão presentes na superfície do parasita, as EBLs e RBLs estão localizadas nos micronemas ou nos “pescoços” das róprias antes da invasão (Figura 6).

Algumas proteínas mencionadas acima e outras relevantes envolvidas no processo de invasão de *P. vivax* serão detalhadas nos tópicos a seguir.

### 1.7.1 Moléculas envolvidas no processo de invasão

#### 1.7.1.1 PvRBPs

Galinski e colaboradores (1992) descreveram duas novas proteínas de *P. vivax*, com 250 kDa cada, oriundas da cepa Belém e localizadas no pólo apical de merozoítos. Essas proteínas interagem especificamente com reticulócitos e foram inicialmente denominadas PvRBP-1 e PvRBP-2. Anos mais tarde, com o sequenciamento genômico completo de *P. vivax*, foram identificados 11 membros da família PvRBP, que abrangem os genes: *Pvrbp1a*, *Pvrbp1b*, *Pvrbp2a*, *Pvrbp2b*, *Pvrbp2c*, *Pvrbp1p1*, *Pvrbp2p1* e *Pvrbp2p2*. Outros 3 foram considerados pseudogenes: *Pvrbp2d*, *Pvrbp2e*, *Pvrbp3* (CARLTON et al, 2008; HESTER et al., 2013). As PvRBP-1 e PvRBP-2 originais, descritas por Galinski et al. (1992), correspondem a *Pvrbp1a* e *Pvrbp2c*, respectivamente, usando como referência o genoma da cepa Sal I. Pouco se sabe sobre a maioria dos membros dessa família, embora muitos genes PvRBP sejam expressos nos estágios tardios dos esquizontes (BOZDECH et al., 2008). Até o momento, ainda não foi descrito nenhum receptor de membrana do eritrócito que interage com essa família.

A identificação inesperada de genes *rbp* de *P. vivax* por Carlton et al. (2008), incluindo múltiplos genes *rpb2*, de acordo com os autores, revela que *P. vivax* pode possuir uma diversidade de mecanismos de invasão comparados a *P. falciparum*. De acordo com os autores, esse achado pode anular o pressuposto de que essa espécie conta apenas um mecanismo de invasão mais simples, via interação PvDBP-DARC e poderia começar a explicar a infecção em indivíduos sem expressão de DARC em suas hemácias.

Através de similaridades entre estrutura do gene e sequências, proteínas homólogas às PvRBPs foram identificadas em *P. falciparum* e *P. yoelii*, como família Pfrh e Py235, respectivamente (GALINSKI; XU; BARNWELL, 2000; RAYNER et al., 2000). Pfrh5, um membro da família Pfrh de *P. falciparum*, é uma conhecida proteína e forte candidata a vacina para essa espécie, devido a sua função essencial no processo de invasão parasitária e baixos níveis de polimorfismos na sua sequência (revisto por PAUL; EGAN; DURASINGH, 2015). Sabe-se que essa proteína interage a um receptor da hemácia denominado basigina (BSG), também conhecido como CD147 (CROSNIER et al., 2011).

A cristalização da proteína PvRBP2a, descrita por Gruszyk e colaboradores (2015), revelou que sua arquitetura é similar à da Pfrh5. Entretanto, já é sabido que o receptor dessa

proteína (ainda não descrito) não pode ser BSG, uma vez que PvRBP2a em contato com células vermelhas se mostra sensível ao tratamento com tripsina, enquanto que PFRH5 interagindo com BSG é resistente. Ainda de acordo com os autores, PvRBP2a é capaz de ligar-se a reticulócitos imaturos que ainda expressam CD71 e também em normócitos, indicando que membros da família PvRBP possam ter diferentes especificidades, tanto para células sanguíneas mais jovens como para maduras.

As proteínas PvRBP1a e PvRBP1b possuem domínios de ligação a eritrócitos homólogos aos de PFRh4, outra proteína da família PFRh de *P. falciparum*, conforme descrito por Han et al. (2016). Os autores demonstraram através de ensaios de imunofluorescência indireta (IFA) que essas duas proteínas se localizam no micronema de esquizontes maduros, bem próximas à proteína PvDBP. A atividade de ligação de ambas foi significativamente maior em reticulócitos do que em normócitos, sugerindo que essas proteínas ligantes possam ter um importante papel na invasão de merozoítos de *P. vivax*. Recentemente, Gupta et al. (2017) confirmaram que a seleção de reticulócitos é mediada por PvRBP1a e PvRBP2c, uma vez que essas proteínas nativas (derivadas de sobrenadante de cultura de *P. vivax*) revelaram sua ligação especificamente em reticulócitos e não em eritrócitos maduros.

Visto que as PvRBPs parecem ter um papel crucial na mediação para especificidade aos reticulócitos, atualmente especula-se que essas proteínas possam ter participação em episódios de invasão Duffy-independente, tornando-as antígenos atrativos para o desenvolvimento de vacinas contra *P. vivax*. Sendo assim, diversos estudos sorológicos vêm sendo conduzidos a fim de avaliar as respostas de anticorpos de indivíduos expostos a malária contra essas proteínas e mais recentemente, a capacidade de anticorpos anti-PvRBP inibirem interações entre essas proteínas e reticulócitos. Hietanen et al. (2015), em um trabalho com 41 pacientes da Tailândia, revelaram uma correlação positiva fraca mas significativa entre os níveis de anticorpos IgG anti-PvRBP1a, PvRBP1b, PvRBP2a, PvRBP2b e PvRBP2c. Os níveis de anticorpos contra essas proteínas foram positivamente correlacionados com a idade, provavelmente refletindo um efeito de exposição acumulativa. Já em Rondônia, em estudo realizado por Tran et al. 2005, revelaram que respostas de anticorpos contra PvRBP1, foram independentes da idade, mas dependente da exposição. Altas respostas de anticorpos contra proteínas recombinantes de PvRBP1a e PvRBP2c foram observadas entre 66 plasmas de indivíduos de área endêmica na Índia. Ensaios de inibição de ligação realizados com “pool” de anticorpos humanos purificados, naturalmente adquiridos de cinco indivíduos com altas

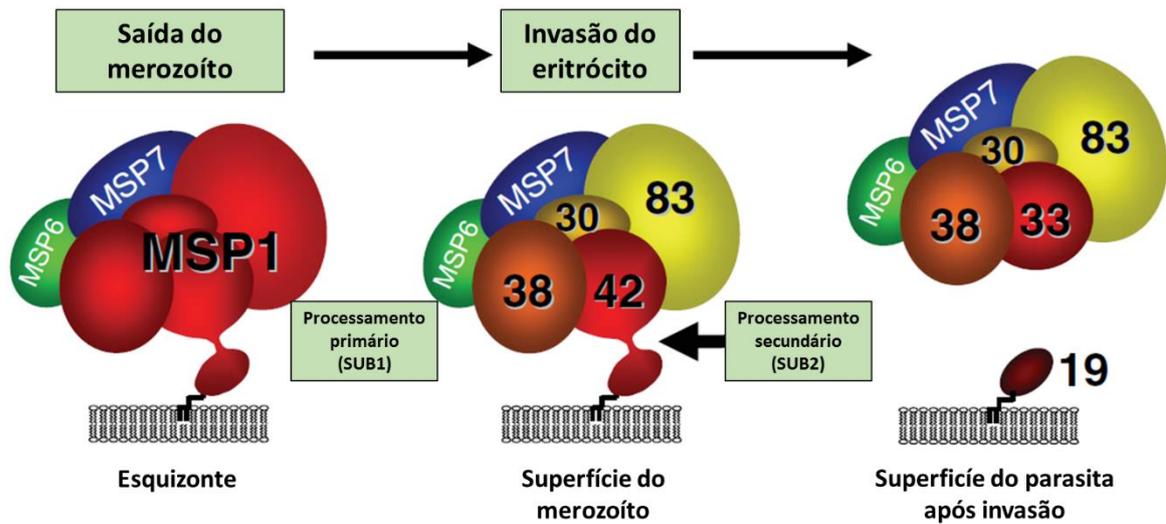
respostas para ambas as proteínas PvRBP2c e PvRBP1a, mostraram 72-80% de inibição de ligação entre essas proteínas e reticulócitos com 100 µg/mL de anticorpos e inibição quase completa na concentração de 200 µg/mL (GUPTA et al., 2017).

#### 1.7.1.2 MSP-1<sub>19</sub> (Fragmento 19 da Proteína 1 da superfície do merozoíto)

Uma das moléculas de superfície mais estudadas de estágios assexuais sanguíneos de parasitas da malária é a proteína 1 de superfície do merozoíto. A MSP-1 é sintetizada no final da esquizogonia, tem aproximadamente 195 kDa; é uma proteína precursora que sofrerá uma série de clivagens, além de ser a mais abundante de todas as proteínas de superfície de merozoíto ancoradas por GPI.

Ainda quando o parasita se encontra na fase intracelular, MSP-1 se associa a outras proteínas de superfície de merozoítos (MSP-7 e MSP-6) formando um complexo que é transportado para sua superfície e se fixa à membrana pela âncora de GPI (HOLDER; FREEMAN, 1981; PACHEBAT et al., 2007). No momento da liberação dos merozoítos da célula infectada, as proteínas desse complexo sofrem um processamento proteolítico pela protease Sub 1, essencial para que ocorra a invasão, visto que a inibição dessa enzima impede o processo de invasão dos merozoítos (KOUSSIS et al., 2009) (Figura 8). Nessa primeira clivagem, MSP-1 dá origem a 4 fragmentos, nomeados de acordo com sua massa molecular aparente: um fragmento N-terminal de 83 kDa (MSP-1<sub>83</sub>), dois fragmentos internos de 30 e 38 kDa (MSP-1<sub>30</sub> e MSP-1<sub>38</sub>) e um fragmento C-terminal de 42 kDa (MSP-1<sub>42</sub>) (Figura 8). Uma mudança profunda na estrutura de MSP-1 ocorre no momento da invasão em células sanguíneas, quando um segundo processamento é iniciado, dessa vez mediado pela enzima Sub 2, que cliva MSP-1<sub>42</sub> em 2 fragmentos: um N-terminal com 33 kDa (MSP-1<sub>33</sub>) e um C-terminal de 19kDa (MSP-1<sub>19</sub>) (HACKETT et al., 1999; HARRIS et al., 2005). Como consequência disso, MSP-1<sub>33</sub> é liberada na circulação, enquanto que MSP-1<sub>19</sub> continua ancorado à membrana do merozoíto (BLACKMAN et al., 1990), mesmo após a sua internalização na hemácia do hospedeiro, conforme mostra a Figura 8. É possível que MSP-1<sub>19</sub> tenha um papel importante nessa fase do desenvolvimento parasitário, pois permanece intacta durante todo o ciclo intracelular do parasita, sendo o primeiro marcador de biogênese do vacúolo alimentar (DLUZEWSKI et al., 2008).

**Figura 8** – Processamento da proteína MSP-1.



**Fonte:** Adaptado de HOLDER, 2009.

Acreditando que MSP-1 promove interações iniciais entre o parasita e a membrana do eritrócito, Chandramohanadas e colaboradores (2014) identificaram uma pequena molécula chamada NIC (2-butil-5-cloro-3-(4-nitro-benzil)-3H-imidazol-4-carbaldeído) capaz de ligar-se a MSP-1 e inibir a invasão de parasitas *P. falciparum* e *P. vivax* em eritrócitos. Essa inibição não se limita apenas ao contato com a molécula no momento da liberação dos merozoítos, mas em momentos prévios, como dentro dos esquizontes em estágios tardios. Para os autores, tal experimento evidenciou o papel fundamental de MSP-1 na invasão de células sanguíneas do hospedeiro. Anos antes, para corroborar com a hipótese de uma proteína de interação inicial, Woehlbier et al. (2010) demonstraram que o bloqueio do processamento secundário de MSP-1 também impede a invasão.

A porção mais estudada de todos os fragmentos de MSP-1 é MSP-1<sub>19</sub>, que, além de ser ancorada na superfície da membrana do parasita via GPI, possui dois domínios do tipo EGF (“*Epidermal Growth factor*” – fator de crescimento epidérmico) (BLACKMAN et al., 1990). Han e colaboradores (2004), afirmaram que, em infecções causadas por *P. vivax*, esses dois domínios funcionam como uma porção de ligação na interação PvMSP-1 em eritrócitos.

Estudos envolvendo *P. falciparum* revelaram que o receptor de MSP-1<sub>19</sub> é a banda 3, uma proteína presente em abundância na membrana do eritrócito (GOEL et al., 2003). Baldwin et al. (2015) mostraram que a região N-terminal de MSP-1<sub>83</sub> interage com glicoforina A (GPA),

também abundante na superfície dos eritrócitos, propondo um novo modelo de invasão em que múltiplas subunidades de MSP-1 se ligam ao complexo banda 3 – GPA da membrana eritrocitária durante o estágio de invasão inicial. Seguem-se interações adicionais entre ligantes do parasita e receptores nas hemácias que culminam na reorientação, penetração nos eritrócitos e consequente liberação da maior parte do complexo MSP-1.

De acordo com Folegatti et al. (2017), a maioria dos estudos soro-epidemiológicos envolvendo malária na Bacia Amazônica brasileira são focados no antígeno PvMSP-1<sub>19</sub>. Suarez-Mutiz et al. (2007) em um estudo com 98 indivíduos de comunidades ribeirinhas do Amazonas revelou que 46,9% deles possuíam anticorpos contra essa proteína e que a probabilidade de ser respondedor se encontrava maior em indivíduos acima de 15 anos de idade. Um maior número de respondedores foi encontrado por Ladeia-Andrade et al. (2007), através de dois cortes transversais realizados com indivíduos ribeirinhos de áreas endêmicas, também no Amazonas. Nesse estudo, anticorpos anti-PvMSP-1<sub>19</sub> foram encontrados em 69,6% dos indivíduos com amostras de plasmas coletadas durante a estação chuvosa e 64% durante a estação seca. A idade também foi correlacionada com soroposividade, além de local da residência, presença de infecção atual, assim como visita recente a áreas de alto-risco para doença. Cerca de 50% dos indivíduos responderam para PfMSP-1<sub>19</sub>, nas duas estações e a idade também foi significativamente associada à soroconversão.

Para Kano et al. (2012), a idade não foi associada com magnitude de resposta contra essa proteína e existe uma forte associação entre número de episódios prévios e recente exposição para presença de anticorpos anti- PvMSP-1<sub>19</sub>, como observado no estudo com indivíduos provenientes de Rio Pardo (Amazonas). Em Belém, Soares et al. (1999) encontraram que a frequência de respondedores foi maior entre aqueles com episódio de recente, do que infectados há mais de 6 meses ou sem histórico de doença sintomática, enfatizando que essa proteína é altamente imunogênica durante infecções naturais por *P. vivax*. Barbedo et al. (2007) trabalhando com 220 amostras de indivíduos com infecção por *P. vivax*, não encontraram diferenças significativas no número de respondedores para PvMSP-1<sub>19</sub> em primo-infecção ou aqueles infectados várias vezes. Quase todos os participantes do estudo que foram múltiplas vezes infectados (95%), apresentaram anticorpos contra essa proteína, porém apenas 56,6% continuaram mantendo esses anticorpos 9 meses depois do tratamento e livres de malária.

### 1.7.1.3 MSP-3 (Proteína 3 da superfície do merozoíto)

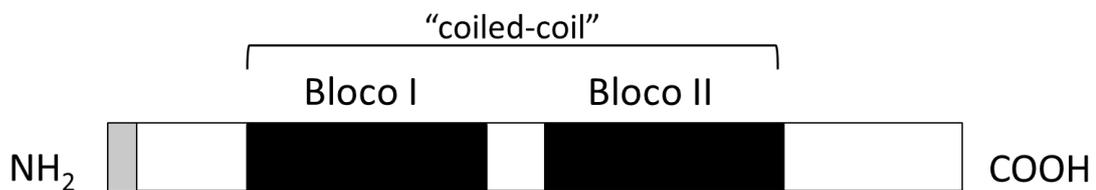
A MSP-3 de *P. vivax* é uma proteína que se encontra associada, porém não fixada a membrana do merozoíto e foi inicialmente caracterizada como uma família de proteínas com 3 genes relacionados: *pvmmsp3-α*, *pvmmsp3-β* e *pvmmsp3*. Cada um desses genes *pvmmsp3* codifica uma proteína com domínio central rico em alanina, com predição para formar estrutura secundária de forma  $\alpha$ -helicoidal e estrutura terciária do tipo *coiled-coil*, que favorecem as interações proteína-proteína (GALINSKI et al., 1999; 2001).

O sequenciamento do genoma da cepa Sal I (CARLTON et al., 2008), revelou a presença de uma família de genes *pvmmsp3* com 11 membros, ocorrendo em conjunto, em uma região de aproximadamente 60 Kb no cromossomo 10 de *P. vivax*. Esses genes mostram baixa similaridade com quatro membros da família do gene *mmsp3* de *P. falciparum*, também no cromossomo 10 e com dois genes *mmsp3* em *P. knowlesi*, localizados em diferentes cromossomos. Entre os produtos desses genes de *P. vivax*, destacam-se MSP-3 $\alpha$ , MSP-3 $\beta$  e MSP-3 $\gamma$ , que mais tarde foram renomeados como PvMSP3.10, PvMSP-3.3 e PvMSP3.1, respectivamente, de acordo com a posição do gene no cromossomo. As mais estudadas, PvMSP-3 $\alpha$  e PvMSP-3 $\beta$ , estão presentes na superfície dos merozoítos dentro de esquizontes maduros, ainda em células sanguíneas infectadas. PvMSP-3 $\alpha$  é também encontrada em trofozoítos e merozoítos livres, mesmo com a falta de domínio transmembrana do tipo GPI (GALINSKI et al., 1999; 2001; JIANG et al., 2013). Conforme Jiang e colaboradores (2013), o tempo de expressão e localização precisa das proteínas PvMSP3s diferem entre os trofozoítos, esquizontes ou merozoítos livres, com a expressão da maioria delas durante o estágio de esquizonte.

De acordo com Galinski et al. (1999), a proteína PvMSP-3 $\alpha$  é constituída de 845 aminoácidos e tem massa molecular aparente de 150 kDa. A extremidade de sua região N-terminal inclui a sequência sinal e é relativamente bem conservada. Na porção central, existem seis regiões principais ricas em alanina formando domínios tipo “heptads” (motivos de sete aminoácidos), repetidos o suficiente e com composição de aminoácidos necessária para a formação das *coiled-coils*. Esses resíduos de alanina estão presentes normalmente (mas não sempre) nas posições um e quatro, dentro dos *heptads*. Esses domínios ricos em alanina se estendem na maior parte da proteína, porém o polimorfismo é altamente confinado à metade do domínio N-terminal, enquanto que a metade do domínio C-terminal se mantém

conservado. A proteína possui subdomínios envolvidos em dois blocos (Bloco I: porção N-terminal polimórfica, e Bloco II: região C-terminal de pouca variabilidade). Em ambos os subdomínios definidos há uma alta probabilidade de formação de estrutura do tipo *coiled-coil* (Figura 9) (GALINSKI et al., 1999; RAYNER et al., 2002).

**Figura 9** – Representação esquemática da proteína da proteína MSP-3 $\alpha$  de *Plasmodium vivax*. As regiões com alta predição para formação de *coiled-coil* estão destacadas em preto.



**Fonte:** Adaptado de Rayner et al. (2002).

MSP-3 $\beta$  possui massa molecular aparente de 104 kDa, sendo constituída por 33-659 aminoácidos. O aminoácido alanina compõe 23% do domínio central desta proteína e estão organizadas também como motivos “heptads”. Assim como MSP-3 $\alpha$ , MSP-3 $\beta$  também possui um peptídeo sinal na região N-terminal e cinco regiões para a formação de *coiled-coils* (GALINSKI et al., 2001). A manutenção da estrutura terciária *coiled-coil* em regiões muito polimórficas pode indicar que esses domínios são importantes para ponto de vista funcional da proteína (RAYNER et al., 2002).

Muito se discute sobre a função das MSP3s e de acordo com Boyle et al. (2014), as proteínas MSP-3, MSP7, SERA4 e SERA5 de *P. falciparum* são perdidas na superfície do merozoíto durante o processo de invasão, no ponto da formação da junção irreversível. Essa observação foi possível através de marcações com anticorpos policlonais específicos para cada uma delas, que não são encontradas na região do merozoíto que passou através da junção irreversível para dentro do eritrócito. Durante o experimento realizado, essas proteínas foram encontradas no sobrenadante da cultura após a invasão, enfatizando o desligamento das mesmas durante esse processo. Tal achado indica que essas proteínas têm alguma função durante o processo de invasão, sendo posteriormente descartadas quando o parasita é internalizado.

PvMSP-3 $\alpha$  é uma proteína sabidamente imunogênica e uma das possíveis candidatas a vacina contra essa espécie. Lima-Junior et al. (2011) descreveram um estudo sorológico-epidemiológico com 282 indivíduos naturalmente expostos à malária no estado de Rondônia. Utilizaram proteínas recombinantes derivadas de 5 sub-fragmentos do gene *pvmSP3 $\alpha$* : a região N-terminal (nucleotídeos 73-309), Bloco I (nucleotídeos 316-1242), Bloco II (nucleotídeos 1246-2058), a região C-terminal nucleotídeos (nucleotídeos 2059-2523) e a proteína inteira (nucleotídeos 73-2520). A prevalência de anticorpos IgG para a recombinante com o comprimento total da proteína foi de 78% e os índices de reatividade aumentaram com anos de residência em área endêmica. Nesse estudo também foi realizado um mapa de epítomos de células B, que mostrou o reconhecimento de pelo menos 25 determinantes antigênicos lineares na proteína inteira, localizados principalmente nos dois blocos de repetição (11 epítomos para Bloco I e 7 epítomos para Bloco II), confirmando a alta imunogenicidade dessa região, especialmente no Bloco I da região N-terminal.

A presença de anticorpos contra a região de Bloco II dessa proteína foram associados com redução para risco de malária vivax clínica em um estudo envolvendo 183 crianças de 1 a 3 anos em Papua Nova Guiné. Utilizando proteínas recombinantes para Bloco I, Bloco II, regiões N-terminal e C-terminal de PvMSP-3 $\alpha$ , Stanisic e colaboradores (2013) mostraram que 23,5% dessas crianças possuíam anticorpos para todas as regiões da proteína.

Outros estudos foram feitos com indivíduos com infecção patente para *P. vivax* na Amazônia brasileira por Bitencourt et al. (2013) e Mourão et al. (2012). No primeiro, com 220 indivíduos, os autores encontraram que 68,2% deles possuíam anticorpos anti-PvMSP-3 $\alpha$  e 79,1% anti-PvMSP-3 $\beta$ . Já Mourão et al. (2012), empregando uma proteína recombinante PvMSP-3 $\alpha$  que continha os aminoácidos 359-798 da região C-terminal, testou a imunogenicidade da mesma em ensaio sorológico com 190 indivíduos. De acordo com os autores, 58,4% das pessoas estudadas possuíam anticorpos contra PvMSP-3 $\alpha$ , enquanto que 88,9% contra a imunogênica PvMSP-1<sub>19</sub>. Para ambas as proteínas utilizadas nesse estudo, as magnitudes de respostas de anticorpos IgG tendem a ser baixas em indivíduos em primoinfecção, sugerindo que a exposição acumulativa a malária pode ser um bom preditor da presença desses anticorpos.

#### 1.7.1.4 MSP-9 (Proteína 9 da superfície do merozoíto)

Inicialmente identificada em *P. falciparum* como antígeno ABRA (*Acid-Basic Repetitive Antigen*) ou p101, MSP-9 foi descrita em *P. vivax* por Barnwell e colaboradores (1999), que identificaram a existência de uma proteína expressa durante a esquizogonia, que se organiza na superfície do merozoíto e a nomearam de PvMSP-185, baseado em seu peso molecular aparente. Nesse estudo, também foram identificadas proteínas homólogas em *P. cynomolgi* e *P. knowlesi*. Mais tarde, essas proteínas receberam as nomenclaturas de PvMSP-9, PcyMSP-9 e PkMSP-9 (VARGAS-SERRATO et al., 2002).

PvMSP-9 tem 979 aminoácidos (Figura 10), enquanto que PcyMSP-9 e PkMSP-9; 818 e 707, respectivamente. Cada uma dessas proteínas possuem um peptídeo sinal na extremidade da região N-terminal, que é bem conservada entre as espécies, seguidos de 4 resíduos de cisteína dentro dos primeiros 72 aminoácidos e a região C-terminal, que contém os blocos de repetição de aminoácidos espécie-específicos: *P. vivax* e *P. cynomolgi* possuem dois blocos com repetidos aminoácidos (Figura 10) e MSP-9 de *P. knowlesi* e *P. falciparum*, apenas um e um *stop-codon* TAG final (VARGAS-SERRATO et al., 2002).

**Figura 10** – Representação esquemática da proteína MSP-9 de *P. vivax*



**Nota:** CCCC indicam os resíduos de cisteína. Os domínios repetidos da região C-terminal estão representados pelo Bloco I e II. A área cinza na região N-terminal indica a presença de peptídeo sinal.

**Fonte:** Adaptado de Oliveira-Ferreira et al., 2004.

Assim como membros da família PvMSP-3, PvMSP-9 não possui nenhum domínio transmembrana ou é ancorado via GPI à superfície do merozoíto. Bem como uma clássica proteína MSP de *Plasmodium*, MSP-9 é encontrada na superfície de merozoítos. Seu papel no ciclo de vida parasitário ainda é incerto, embora o anticorpo monoclonal anti-PvMSP-9 seja capaz de interferir na habilidade do parasita em invadir células sanguíneas do hospedeiro (BARNWELL et al., 1999; VARGAS-SERRATO et al., 2002). Sabe-se que essa proteína faz

associação com MSP-1<sub>19</sub> formando um complexo, que se liga a regiões de banda 3 na membrana do eritrócito (KARIUKI et al., 2005).

O primeiro trabalho no Brasil investigando a imunogenicidade de PvMSP-9 foi realizado por Oliveira-Ferreira et al. (2004) utilizando camundongos e amostras de plasma humanas (n=55) oriundas de duas comunidades (Ribeirinha e Colina) em Rondônia e proteínas MSP-9 das regiões N-terminal e do Bloco II de *P. vivax*. Esse estudo inicial demonstrou que ambas as proteínas são imunogênicas em camundongos e anticorpos naturalmente adquiridos anti-PvMSP-9 podem ser encontrados em população exposta à malária causada por essa espécie. Em 2008, foi realizado um novo estudo com essas duas comunidades em Rondônia, agora com um número maior de participantes (n=360) e sorologia para as regiões N-terminal (PvMSP-9 NT), Bloco II (PvMSP-9 RII) e Bloco I junto com Bloco II (PvMSP-9 RIRII) de PvMSP-9. Setenta e quatro por cento do total de indivíduos estudados possuíam anticorpos contra pelo menos uma dessas regiões. Ribeirinha foi a comunidade com maior número de respondedores e a proteína PvMSP-9 RIRII, a mais imunogênica. De modo geral, esse estudo revelou que os domínios C-terminal e N-terminal são alvo de resposta imune de indivíduos naturalmente expostos à malária causada por *P. vivax* e níveis de anticorpos anti-PvMSP-9 RIRII e PvMSP-9 RII foram correlacionados positivamente com o tempo de residência em região endêmica (LIMA-JUNIOR et al., 2008).

Em contrapartida, PvMSP-9 RIRII se mostrou menos imunogênica em um estudo envolvendo 183 crianças de 1 a 3 anos de idade em Papua Nova Guiné. Nesse levantamento, 45,9% dos participantes possuíam anticorpos contra a região N-terminal (PvMSP-9 NT) da proteína e apenas 8,7% tinham anticorpos IgG contra PvMSP-9 RIRII. Crianças em estado de infecção patente foram mais propensas à presença de anticorpos contra a porção N-terminal, além de significativa diminuição no risco de malária clínica e aumento de proteção contra infecção por *P. vivax* associado a presença de altos níveis de anticorpos IgG contra essa região (STANISIC et al., 2013).

Recentemente, Rodrigues da Silva et al. (2016) mapearam um epítipo linear de células B dentro de PvMSP-9 e confirmaram sua imunogenicidade através de peptídeo sintético em um estudo soro-epidemiológico. Para mapear eventuais epítipos, a sequência inteira da proteína PvMSP-9 foi analisada e a região E795-A808 (EAAPENAEPVHENA), situada no Bloco I, dentro da região C-terminal foi identificado como um epítipo linear de célula B. O próximo passo do estudo foi testar a imunogenicidade desse epítipo através de peptídeo sintético

(PvMSP-9<sub>E795-A808</sub>). Respostas de anticorpos contra a variante PvMSP-9 RIRII, que contém os Blocos I e II da região C-terminal (e conseqüente o epítipo testado) também foram avaliadas. Amostras de plasmas das comunidades de Ribeira e Colina (Rondônia) revelaram que 58% dos 545 participantes do estudo possuíam anticorpos anti- PvMSP-9 RIRII. Já PvMSP-9<sub>E795-A808</sub>, foi capaz de produzir respostas em 32,5% dos indivíduos testados. Dentre aqueles que possuíam anticorpos para PvMSP-9 RIRII, 56% responderam também para PvMSP-9<sub>E795-A808</sub>. Para os autores, anticorpos contra esse epítipo linear foram responsáveis pela proporção de respostas imunes para PvMSP-9 RIRII expressa como proteína recombinante. Esses achados servem de base para a inclusão desse epítipo em futuros ensaios de vacinas multi-alvo com peptídeos sintéticos contra *P. vivax*.

#### 1.7.1.5 AMA- 1 (Antígeno 1 de Membrana Apical)

A proteína mais estudada do filo Apicomplexa, o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1), foi primeiramente descrita na década de 80 como um antígeno presente na superfície de merozoítos *P. knowlesi* (DEANS et al., 1984), possuindo ortólogos em pelo menos duas espécies do filo Apicomplexa: *Babesia bovis* (GAFFAR et al., 2004) e *Toxoplasma gondii* (DONAHUE et al., 2000; HELH et al., 2000). No gênero *Plasmodium*, AMA-1 está presente inicialmente nos micronemas e posteriormente na superfície de merozoítos de todas as espécies.

AMA-1 é uma proteína de membrana integral do tipo I, que possui entre 556 a 563 aminoácidos na maioria das espécies de *Plasmodium*. AMA-1, assim como MSP-1, sofre clivagens. A primeira ocorre quando a proteína precursora de 83 kDa, encontrada nos micronemas, sofre uma quebra proteolítica no seu prodomínio N-terminal, gerando uma proteína madura de 66 kDa, que é translocada para a superfície do merozoíto. Durante a invasão, um segundo processamento dessa proteína resulta em fragmentos de 44 ou 48 kDa, que são liberados na corrente sanguínea (BANNISTER et al., 2003; HOWELL et al., 2001; NARUM; THOMAS, 1994).

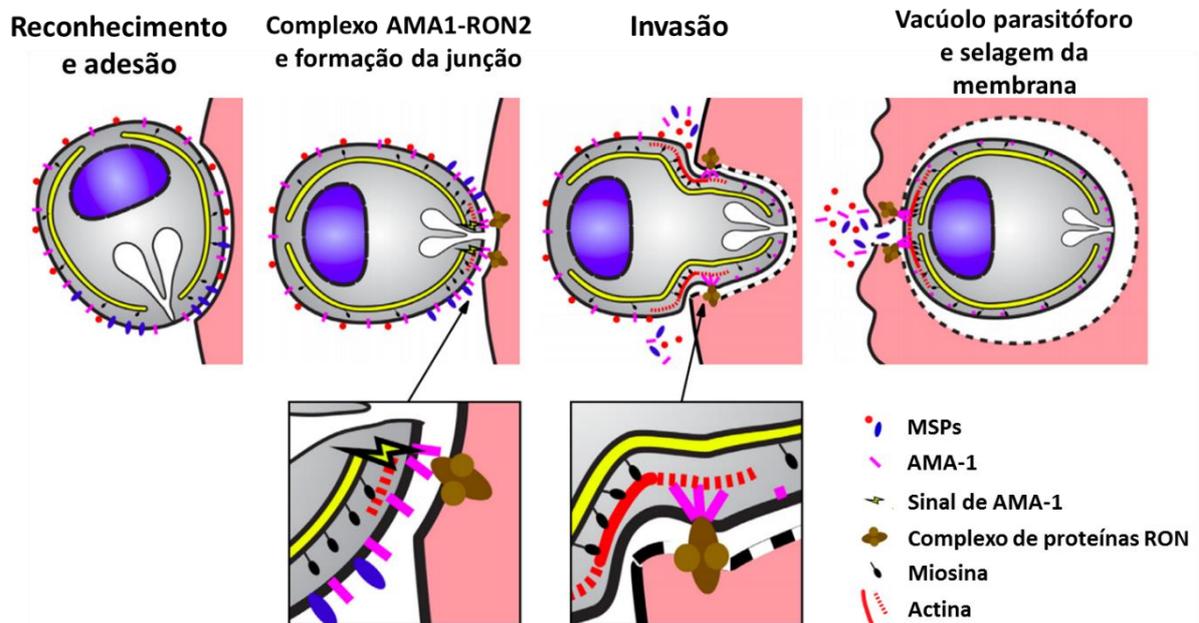
Estruturalmente, AMA-1 possui um domínio N-terminal rico em cisteína, uma única região transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático C-terminal. Grande parte da proteína é formada pela região do ectodomínio, onde 16 cisteínas bem conservadas

contribuem para a formação de 8 pontes de dissulfeto e sugerem o seu dobramento em uma região N-terminal e três domínios (DI, DII e DIII) (REMARQUE et al., 2008; WATERS et al., 1990).

Existem evidências de que essa proteína tem um papel central durante a invasão em células do hospedeiro por parasitas do filo Apicomplexa. Ao estudar a organização molecular do processo envolvido na formação da junção móvel de *Toxoplasma gondii*, Besteiro e colaboradores (2009) propuseram a existência de um mecanismo pelos quais o parasita fornece tanto o ligante como o receptor para formar uma junção entre a membrana do parasita e do hospedeiro. Esse mecanismo, que atua como um complexo de ancoragem para o parasita, faz com que ele dependa menos de interações com células-alvo do hospedeiro, facilitando a invasão. Para falarmos sobre esse mecanismo é necessário abordar as rôptrias, já mencionadas durante a descrição do processo de invasão. Dentro dessas estruturas, localiza-se um complexo de proteínas denominado RON (proteínas derivadas do pescoço das rôptrias): RON 2, RON 4 e RON 5 (em *T. gondii* também é possível encontrar RON 8). Esse complexo de proteínas parece se translocar para célula hospedeira e funcionar como um receptor de AMA-1, que é secretada pelos micronemas (revisto por HARVEY et al., 2014).

Então, de maneira geral, quando se trata de plasmódios, após o contato inicial mediado pelas MSPs, no momento em que o merozoíto se encontra apicalmente justaposto na membrana do eritrócito, o complexo de proteínas derivadas do pescoço das rôptrias (RON) se transloca para dentro da célula do hospedeiro a fim de atuar como receptor de AMA-1 (complexo AMA1–RON2) (Figura 11). Essa interação fornece um forte ponto de ancoragem na superfície da célula do hospedeiro, permitindo que o parasita se internalize. Durante a invasão, o motor de actina-miosina utiliza o anel formado na junção irreversível como um ponto de tração para direcionar a penetração (Figura 11). Nessa fase, o domínio citoplasmático de AMA-1 pode desempenhar papel conectando o motor de invasão ou então, coordenando o processo agindo como um componente de sinalização (revisto por HARVEY et al., 2014).

**Figura 11** – Mecanismo hipotético de interação entre AMA-1 de *Plasmodium spp.* e o eritrócito do hospedeiro.



**Fonte:** Adaptado de Harvey et al. (2014)

Em 2011, Lamarque e colaboradores revelaram que, dentro do complexo de proteínas do pescoço da rópria, existe uma interação específica entre RON-2 e AMA-1 tanto em *P. falciparum* como para *T. gondii*. Posteriormente, Hossain, Dhawan e Mohammed (2012), utilizando ensaios de imunofluorescência, revelaram a co-localização dessas duas proteínas juntas na porção apical final de merozoítos de *P. falciparum* durante a invasão de hemácias. Segundo os autores, a ligação parasita-hemácia se dá através da porção C-terminal de RON-2, rica em cisteína, sendo a porção dessa proteína que se liga especificamente em AMA-1 também rica nesse aminoácido. Entretanto, um importante trabalho publicado por Bargieri et al. (2014), utilizando taquizoítos de *T. gondii*, merozoítos e esporozoítos de *P. berguei* que não expressavam a proteína AMA-1, mostrou que a interação entre AMA1-RON2 parece não ser crucial para a formação de junção e consecutiva invasão, uma vez que esses parasitas ainda eram invasivos e apresentaram uma penetração normal nas células hospedeiras. Segundo os autores, AMA-1 pode atuar de forma independente do complexo de proteínas RON, favorecendo a adesão dos parasitas às células hospedeiras antes da formação do anel, mas não na internalização dos mesmos.

Levantamentos sorológicos visando a avaliar respostas de anticorpos naturalmente adquiridos contra PvAMA-1 no Brasil foram realizados por Rodrigues et al. (2005), Barbedo et al. (2007), Cunha et al. (2014), Sanchez-Arcila et al. (2015), Tomaz et al. (2015), entre outros. No estudo desenvolvido com 83 indivíduos com diagnóstico de infecção por *P. vivax* em Goianésia (Pará) por Tomaz et al. (2015), essa proteína se mostrou imunogênica com 73% de respondedores e dentre os que eram primo-infectados, uma alta proporção de não respondedores. Resultados semelhantes foram encontrados por Barbedo et al. (2007) com 220 indivíduos do Pará em estado de infecção patente por essa mesma espécie, com 72,7% de respondedores para PvAMA-1. Os autores também observaram um número menor de respondedores dentre aqueles experimentavam uma primeira infecção a malária no momento da coleta do sangue, sugerindo que a soroversão a essa proteína pode ocorrer após exposição maior ao parasita.

#### 1.7.1.6 PvDBP (*Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*)

Em *P. vivax*, o processo de invasão ao eritrócito com a formação da ligação irreversível é mediado pela interação entre *Duffy binding protein* (PvDBP) e seu receptor nas células sanguíneas do hospedeiro, o grupo sanguíneo Duffy (DARC) (WERTHEIMER; BARNWELL, 1989). Assim como em *P. vivax*, essa proteína é encontrada em merozoítos de *P. knowlesi* (PkDBP $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e também está envolvida no processo de invasão eritrocitário nessa espécie (embora apenas PkDBP $\alpha$  seja capaz de se ligar com antígeno DARC de humanos) (ADAMS et al., 1990; HAYNES et al., 1988; SINGH et al., 2005). Acredita-se que após a ligação irreversível (entre PvDBP-DARC), dá-se início a formação da junção, também irreversível, mediada por AMA-1 e proteínas do complexo RON (NIZ et al., 2017).

Essa proteína foi primeiro detectada em merozoítos de esquizontes em desenvolvimento tardio (próximos do rompimento da hemácia) e nos livres, dentro dos micronemas. PvDBP é somente liberada para a superfície da porção apical dos merozoítos após ocorrerem as interações iniciais e reorientação do parasita, quando se inicia o processo de invasão. Esse mecanismo reduz a exposição dessa proteína ao sistema imune, podendo esse ser um mecanismo adicional de evasão (ADAMS et al., 1990; GRIMBERG et al., 2007).

A *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* é uma molécula de 140 kDa, pertencente à superfamília das EBLs (*erythrocyte-binding ligands*) ou EBAs (*erythrocyte-binding antigens*)

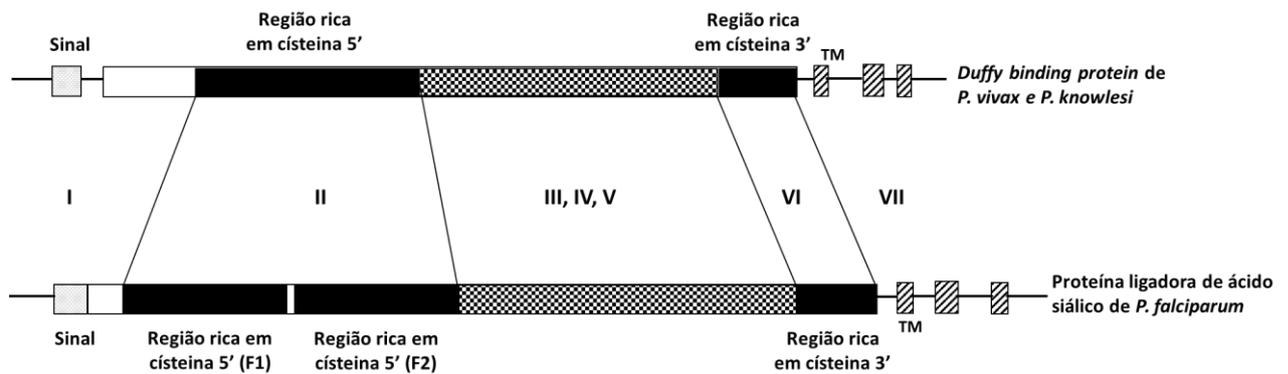
em *P. falciparum*. Membros dessa família têm papel de reconhecimento e ligação a eritrócitos através de interações específicas. Proteínas EBLs podem conter um ou dois domínios DBL (*Duffy binding-like*), sendo um em *P. vivax* e dois em *P. falciparum* (Figura 12). Nesses domínios situam-se os sítios de ligação das proteínas aos eritrócitos (ADAMS et al., 1990; 1992).

As EBLs, juntamente com as proteínas RBL (*reticulocyte binding-like*), ficam armazenadas nos micronemas e róptrias antes da invasão, sendo liberadas na porção apical do merozoíto durante o processo de invasão. Essa família de proteínas é igualmente conhecida como DBP-EBL (*Duffy binding like-erythrocyte binding protein*) e podem ser encontradas também em *P. falciparum*, incluindo nessa espécie PfEBA-175, PfEBA-140/BAEBL, PfEBL-1 e PfEBA-181/JESEBL (ADAMS et al., 1990; 1992; SIM et al., 1990; THOMPSON et al., 2001).

A inclusão de proteínas de *P. falciparum* na mesma família das *Duffy binding proteins* é baseada na similaridade entre as estruturas dos genes dessas proteínas e na semelhança estrutural dos aminoácidos nas regiões ricas em cisteína 5' e 3', sendo que a proteína de *P. falciparum* difere de *P. vivax* pela presença de duas cópias (F1 e F2) no domínio DBL (região rica em cisteína 5') (Figura 12). Doze resíduos de cisteína têm a mesma localização entre as espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. knowlesi*, porém em *P. falciparum* elas se localizam nos motivos repetidos (F1 e F2). Estruturalmente, membros da família DBL-EBP possuem seis regiões extracelulares (I-VI) seguido de um domínio transmembrana do tipo I e uma curta cauda citoplasmática, conforme pode ser observado na Figura 12 (ADAMS et al., 1992; 2001).

Em *P. falciparum*, proteínas da família das EBLs e PFRHs tem papel crucial durante a invasão (COWMAN; CRABB, 2006). PfEBA-175 tem como receptor glicoforina A (GYPA), encontrada em abundância na superfície de hemácias, enquanto que o receptor para PfEBA-140 é a glicoforina C (GYPC). Ambas se unem aos respectivos receptores por ação dependente a ácido siálico. As EBLs e PFRHs nessa espécie permitem o uso de uma vasta gama de diferentes vias de invasão (MAIER et al., 2003; ORLANDI; KLOTZ; HAYNES, 1992), ao contrário de *P. vivax*, que depende de um único receptor conhecido para a formação da ligação irreversível e invasão.

**Figura 12** – Comparação estrutural dos genes de *P. vivax*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*.



**Nota:** Sinal – região do peptídeo sinal, TM - região transmembrana. I, II, III, IV, V, VI e VII indicam regiões das proteínas.

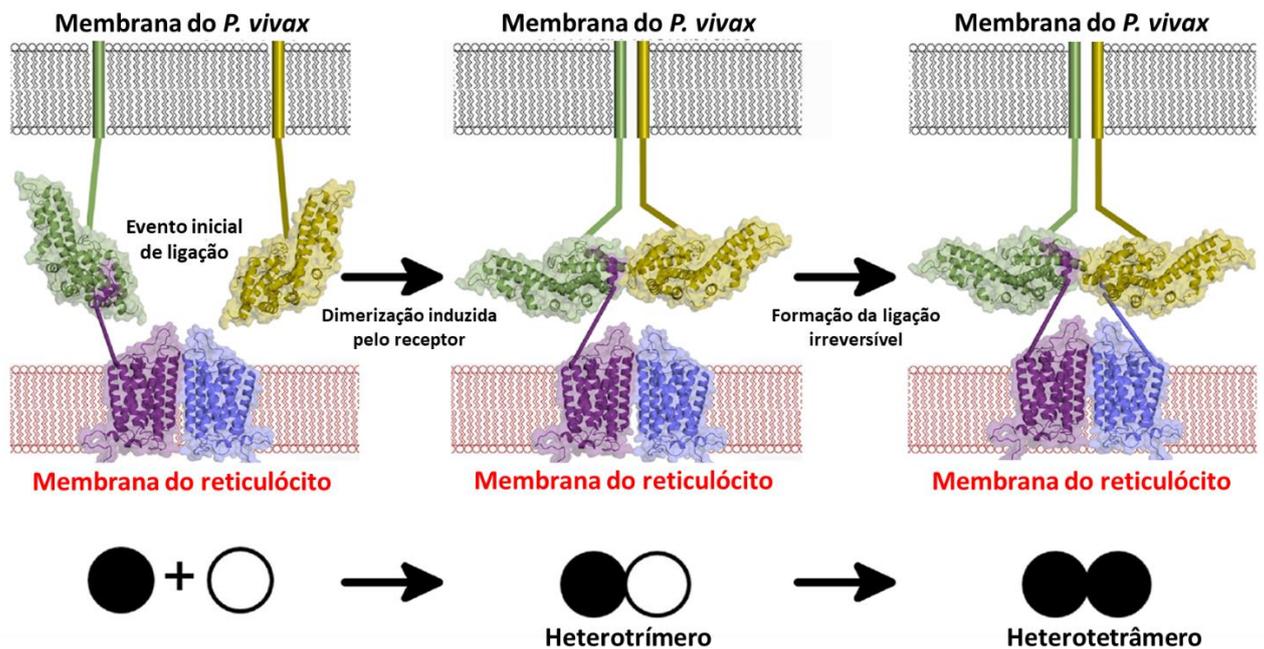
**Fonte:** Adaptado de Adams et al. (1992)

O domínio DBL de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. knowlesi* localiza-se na região II da proteína (Figura 12), na porção N-terminal. Em *P. vivax* essa região contém cerca de 330 aminoácidos e seu sítio de ligação ao eritrócito situa-se em um trecho de 170 aminoácidos, na área entre as cisteínas 4 e 7 (SINGH et al., 2003; VANBUSKIRK et al., 2004a). Essa região é dividida em 3 subdomínios: S1, S2 e S3, que são estabilizados entre-si por pontes de dissulfeto intra-subdomínio (BATCHELOR; ZAHM; TOLIA, 2011). O subdomínio S2 é aquele que contém os resíduos de aminoácidos necessários para o reconhecimento de DARC (BATCHELOR; ZAHM; TOLIA, 2011; 2014; SINGH et al., 2003).

Nos anos de 2011 e 2014, Batchelor e colaboradores propuseram um modelo de interação molecular e estrutural de PvDBP-DARC, no qual ocorre a dimerização de DBP influenciada por DARC (Figura 13). Segundo os autores, após o reconhecimento e evento inicial de ligação entre DBP-DARC, ocorre o processo de dimerização da proteína induzido pelo receptor (DARC), formando um heterotrímero, ou seja, 2 moléculas de DBP e 1 molécula de DARC (Figura 13). Essa segunda molécula de DBP se localiza próxima ao segundo ectodomínio do homodímero DARC, então, o segundo evento de ligação ocorre e cria um heterotrâmero (ligação de 2 moléculas de DBP e duas moléculas de DARC). O processo de dimerização da proteína para a invasão de hemácias também é encontrado em PfEBA-175 (TOLIA et al., 2005).

A dimerização de PvDBP é um processo crítico e conduzido por interação com DARC, levando a formação de um complexo estável de alta-afinidade, que antecipa a formação da junção irreversível, ocasionando a entrada do parasita para dentro dos eritrócitos (BATCHELOR; ZAHM; TOLIA, 2011; 2014; NTUMNGIA et al., 2016).

**Figura 13** – Modelo de interação DBP-DARC durante o processo de invasão.



**Nota:** DBP-1 está em verde, DBP-2 em amarelo. Moléculas DARC19-30, em roxo e lilás.

Círculos pretos indicam ligação a DBPII, círculos brancos, não-ligação a DBPII.

**Fonte:** Adaptado de Batchelor et al. (2014).

Choe e colaboradores (2005), demonstraram que duas tirosinas na região N-terminal de DARC são modificadas por sulfato e uma dessas tirosinas sulfatadas (Tyr 41) é essencial para associação com PvDBP e PkDBP $\alpha$ . Entretanto, Batchelor et al. (2014) através da cristalização da região II de PvDBP (PvDBPII) em contato com DARC, não revelou nenhum contato entre PvDBPII e Tyr41, sugerindo que a modificação do resíduo não facilitou diretamente a interação entre PvDBP-DARC, mas provavelmente modificou a forma de apresentação de DARC ou sua exposição (NTUMNGIA et al., 2016). A cristalização de Batchelor et al. (2011; 2014) mostrou que a ligação em DARC ocorre entre os resíduos Q19 e Y30 dessa glicoproteína, sendo que mutações entre os resíduos 20-22 e 24-26, anulam a ligação em DARC, pois todos desses resíduos têm contato direto com PvDBPII, com exceção D21 que não mantém contato direto, mas é um resíduo importante para estabilização da proteína. A dimerização de PvDBP cria um bolso (bolso de ligação à DARC), onde se encaixa a região N-terminal de DARC. Em PvDBP, foi observada a presença de três regiões de ligação à DARC (F261-T266, L270-K289 e Q356-K367), localizadas no subdomínio 2 de PvDBPII, formando contatos críticos com domínio extra-celular de DARC, sendo importantes alvos de imunidade

protetora (BATCHELOR et al., 2014). De acordo com VanBuskirk et al. (2004a) e Batchelor et al. (2014) mutações nessas regiões de ligação em PvDBP provocam total inibição ou perda de ligação entre PvDBP-DARC e conseqüentemente falha na formação do heterotrîmero ou heterotetrâmero (Figura 13).

Além de sítio de ligação a DARC, o domínio II de PvDBP é uma região hipervariável, apresentando múltiplos epítomos com altas taxas de mutações sinônimas e não sinônimas, a maioria localizados no subdomínio 2, que contribuem para induzir proteção imune para infecção por *P. vivax* (CHOOTONG et al., 2010; COLE-TOBIAN et al., 2002; TSUBOI et al., 1994).

De acordo com Batchelor et al. (2011; 2014), Hans et al. (2005) e VanBuskirk et al. (2004a), os resíduos polimórficos de PvDBP podem ser encontrados no subdomínio 2 ao lado de regiões críticas da proteína, como no bolso no qual interage com DARC e na interface dos dímeros de DBP e também longe dos locais de ligação ao receptor, espalhados por regiões não-funcionais da proteína, sugerindo que o parasita gera variações por todo domínio DBL para evasão do sistema imune. Esses dados sugerem que anticorpos protetivos tem como alvo regiões funcionais da proteína, levando a uma interrupção da dimerização de DBP, prevenindo assim, a ligação ao receptor.

Esse padrão de diversidade dentro de um segmento crítico de ligação em eritrócitos é compatível com forte pressão de seleção imune sobre PvDBPII e sugere que variação alélica é um importante mecanismo de evasão imune, resultando em diversas populações polimórficas de parasitas dentro de regiões endêmicas que podem manifestar infecções mistas com a presença de múltiplas cepas (COLE-TOBIAN; KING, 2003; TSUBOI et al., 1994).

A primeira evidência de que PvDBP é naturalmente imunogênica foi publicada por Fraser et al. (1997), em indivíduos de Papua Nova Guiné, seguida de Michon et al. (1998), com indígenas da Colômbia. Anticorpos IgG anti-PvDBP foram encontrados em 60% dos indivíduos analisados em Papua Nova Guiné e 40% em Zacarías, na Colômbia. Este último é um local em que o nível de transmissão para a doença é baixo e instável. Em ambos estudos, o número de respondedores para PvDBP aumentou significativamente de acordo com o aumento da idade dos indivíduos.

Em um estudo realizado por Kano et al. (2012), em uma comunidade no Amazonas chamada Rio Pardo, composta por indivíduos que viveram de 9 a 38 anos na Amazônia, ou seja, possuem um longo tempo de exposição ao parasita, a prevalência desses anticorpos também aumentou com a idade. Nesse estudo, aproximadamente 50% dos indivíduos

possuíam anticorpos contra PvDBP e a probabilidade de ter esses anticorpos aumentou de acordo com o tempo vivido em região Amazônia ou entre aqueles que tiveram mais de 10 episódios prévios de malária.

A exposição prolongada ao parasita, mas não necessariamente recente, parece estar relacionada com a produção de anticorpos anti-PvDBP, uma vez que indivíduos com uma única infecção não são capazes de gerar anticorpos contra essa proteína, de acordo com Cerávolo et al. (2005). Nesse estudo, realizado com pessoas com histórico variável de exposição prévia à infecção, revelou pela primeira vez que a exposição acumulativa ao parasita é um determinante que age independentemente da idade do hospedeiro para a geração de respostas anti-PvDBP. Corroboram esses dados outro trabalho publicado pelo mesmo grupo, com indivíduos de um assentamento rural no Acre, em que os anos de residência na Amazônia (exposição acumulativa) foram fortemente correlacionados com a presença de anticorpos IgG contra essa proteína. De acordo com os autores (SOUZA-SILVA et al., 2010), cada ano adicional de exposição à malária aumentou 2% a probabilidade do indivíduo possuir anticorpos anti-PvDBP. Nesse caso, a idade em si não se correlacionou com a prevalência de anticorpos anti-PvDBP por tratar-se de uma população migrante do sudeste e sul do Brasil, zonas onde a malária não é endêmica.

Sabe-se que nem todos os indivíduos que apresentam resposta contra PvDBP desenvolvem anticorpos inibitórios capazes de impedir a ligação entre essa proteína e seu ligante DARC (KING et al., 2008). Com o propósito de verificar o perfil desses indivíduos que adquirem os chamados BIAs (*binding inhibitory antibodies*) na Amazônia brasileira, Souza-Silva et al. (2010) revelou que 32% (16 indivíduos de um total de 50) dos que apresentavam anticorpos anti-PvDBP foram capazes de inibir a interação de PvDBP-DARC, sendo esses indivíduos mais velhos e com mais tempo de moradia em região amazônica do que aqueles que não apresentaram anticorpos inibitórios. Ainda na Amazônia brasileira, utilizando amostras oriundas de regiões com diferentes níveis de transmissão, Cerávolo e colaboradores (2008) concluíram que a aquisição de anticorpos inibitórios requer um longo tempo de exposição à malária. A maioria das pessoas naturalmente expostas não desenvolve anticorpos que inibem a ligação PvDBP-DARC; entretanto, uma vez adquiridos, esses anticorpos parecem ser estáveis sob exposição contínua à malária (KING et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2010).

Em áreas altamente endêmicas como em Papua Nova Guiné, uma vez adquiridos, anticorpos anti-PvDBP tendem primeiro a conferir uma proteção maior contra cepas

homólogas do que heterólogas. Através das repetidas infecções a múltiplas variantes de PvDBP, indivíduos adquirem imunidade contra outras cepas, com alguns desenvolvendo altos níveis de anticorpos inibitórios e cepa-transcendentes (COLE-TOBIAN et al., 2009; KING et al., 2008).

Além da variação alélica de PvDBP, existem evidências de que polimorfismos genéticos do hospedeiro possam afetar a resposta imune humoral contra malária vivax (KING et al., 2011; MAESTRE et al., 2010). Nesse sentido, um trabalho publicado por King et al. (2011), revelou através de ensaios de citometria de fluxo, uma redução de 40-50% da ligação entre PvDBP<sub>II</sub> e hemácias com genótipo FY\*AFY\*A comparadas com FY\*BFY\*B; já eritrócitos FY\*AFY\*B indicaram intermediária ligação, enquanto que eritrócitos FY\*AFY\*B<sup>ES</sup>, mostraram significativa redução de ligação quando comparado com FY\*A em homozigose. Hemácias FY\*B<sup>ES</sup>FY\*B<sup>ES</sup>, como esperado, não apresentaram ligação com o parasito. Nesse mesmo estudo, foram encontrados que anticorpos anti-PvDBP inibem mais eficientemente a ligação entre PvDBP<sub>II</sub> e eritrócitos FY\*AFY\*A comparado com FY\*BFY\*B. Esses achados *in vitro* foram consistentes com observações *in vivo* do mesmo grupo, em que indivíduos com genótipo FY\*BFY\*B são mais susceptíveis e um efeito significativo de proteção associado ao alelo FY\*A.

Como já mencionado, a interação entre PvDBP-DARC é necessária para o sucesso na invasão de *P. vivax*, logo, a ausência desse receptor nas hemácias de indivíduos Duffy negativos confere proteção em relação a doença causada por *P. vivax* (MILLER et al., 1976). Entretanto, existem relatos de infecções confirmadas por essa espécie em indivíduos DARC negativos residentes em Madagascar (MÉNARD et al., 2010), Maurîtânia (WURTZ et al., 2011), Angola e Guiné Equatorial (MENDES et al., 2011), Camarões (NGASSA MBENDA; DAS, 2014; NGASSA MBENDA; GOUADO; DAS, 2016; RUSSO et al., 2017) e no Brasil (CARVALHO et al. 2012; CAVISINI et al., 2007).

Atualmente a base molecular de invasão de *P. vivax* em eritrócitos DARC negativos é desconhecida, embora haja especulações de que possa envolver PvDBP. Carlton e colaboradores (2008), ao sequenciar a cepa de referência Sal I encontrou apenas um gene *pvdbp*. Anos mais tarde, Ménard et al. (2013) observaram duplicação desse gene em um isolado de *P. vivax* de Madagascar. Curiosamente, essas duplicações também foram encontradas em regiões com alta frequência de indivíduos Duffy negativos (como a Maurîtânia e Madagascar). A especificidade e distribuição da duplicação de PvDBP, de acordo com os autores, pode sugerir que o genoma do parasita esteja quebrando a barreira dos Duffy

negativos, possibilitando de alguma forma sucesso na invasão parasitária desses indivíduos. A duplicação de PvDBP foi confirmada por Pearson et al. (2016), utilizando mais de 200 isolados de *P. vivax* de várias partes do mundo.

Recentemente, a duplicação do gene também foi encontrada em amostras do Camboja, área onde não é reportada a presença de indivíduos Duffy negativos, tornando improvável a hipótese de que a alta prevalência da duplicação do gene esteja associada com invasão de eritrócitos DARC negativos. Duplicações nesse gene são muito mais espalhadas e complexas do que era previsto anteriormente e existem pelo menos duas duplicações distintas circulando globalmente (descritas no Camboja e Madagascar). A mesma duplicação identificada no Camboja foi encontrada em amostras brasileiras (6 em um total de 60 avaliadas), enquanto que a duplicação descrita em Madagascar não foi detectada nessas amostras (HOSTETLER et al., 2016).

A descoberta de um novo gene em *P. vivax* em um isolado do Camboja por Hester et al. (2013), que não está presente na cepa de referência Sal I, forneceu uma nova hipótese para a invasão de eritrócitos Duffy negativos. Esse novo gene (EBP-2) possui características semelhantes daqueles pertencentes à superfamília EBP, como a presença de domínio DBL, cisteínas conservadas e expressão por estágios sanguíneos do parasita. Contrariando as expectativas, Ntumngia et al. (2016) mostrou que a ligação do domínio DBL de EPB-2 é mais restrita que a de PvDBP, ligando-se apenas reticulócitos com alta expressão de CD71 e forte preferência por Duffy positivos, com mínima ligação a eritrócitos Duffy negativos.

Conforme Ntumngia, King e Adams (2012) não é claro se *P. vivax* pode ter evoluído e adaptado o uso de outros receptores de forma completamente independente de DARC. É muito provável que PvDBP permaneça sendo ligante crítico de invasão, mas que o parasita também utilize outros receptores na membrana da hemácia dos eritrócitos para a invasão.

Dada sua importância para o processo de invasão em eritrócitos, PvDBP é um antígeno atraente como candidato a vacina contra estágios sanguíneos dessa espécie. Atualmente, a variante Salvador I foi capaz de gerar respostas de anticorpos cepa-transcendentes em indivíduos nunca expostos à malária do Reino Unido (estudo em fase 1a) (PAYNE et al., 2017).

### 1.8 Anticorpos monoclonais recombinantes humanos anti-PvDBP

O desenvolvimento de técnicas capazes de isolar e produzir quantidades ilimitadas de anticorpos específicos para um determinado antígeno, os chamados anticorpos monoclonais (mAbs), gerou um crescimento explosivo em pesquisas na Imunologia. A capacidade de produzir essas imunoglobulinas com eficiência levou a um maior entendimento sobre a imunidade mediada por anticorpos, causando grande impacto na pesquisa de diversas áreas, permitindo a geração de novas terapias e diagnósticos. Hoje, mAbs são utilizados para o tratamento de doenças como hemoglobinúria paroxística noturna ou síndromes periódicas associadas a criopirina (um grupo de doenças auto-inflamatórias raras), assim como alguns tipos de câncer, esclerose múltipla, asma e artrite reumatóide (ECKER; JONES; LEVINE, 2014).

Há 40 anos, a descoberta de que pacientes com mieloma múltiplo (tumor monoclonal de plasmócitos) apresentam imunoglobulinas monoclonais no sangue e na urina, levou Köhler e Milstein, no ano 1975, ao desenvolvimento de uma metodologia revolucionária chamada hibridoma, onde é possível imortalizar uma célula B (que produz especificamente o anticorpo de interesse) por meio de fusão celular com uma célula de mieloma de origem murina produzindo anticorpos monoclonais. Hoje, existem diversos métodos para a produção de anticorpos monoclonais humanos, como: *Phage display*, camundongos transgênicos, anticorpos monoclonais murinos humanizados, imortalização por vírus *Epstein-Barr* (EBV) e recentemente anticorpos monoclonais recombinantes humanos (ALIPRANDINI, 2015; TABLL et al., 2015).

Das tecnologias listadas acima, a dos anticorpos monoclonais recombinantes humanos é a mais promissora. Essa inovadora técnica desenvolvida na última década pelo grupo de pesquisa de Michel Nussenzweig, da Universidade Rockefeller em Nova York, baseia-se na expressão de mAbs a partir de uma única célula B específica para o antígeno de interesse. Para tanto, linfócitos B são isolados em placas de 96 poços a partir da ligação com o antígeno e, com base no mRNA de cada célula B, cadeias variáveis dos anticorpos são expressas, clonadas em vetores que contém regiões constantes de ambas cadeias e transfectadas em células de mamíferos, gerando uma imunoglobulina inteira. Essa poderosa metodologia permite a análise de centenas de células-B do mesmo indivíduo, além de poder gerar anticorpos

monoclonais em qualquer estágio de maturação (de células pré-B a células B de memória) (TILLER et al., 2008).

Essa técnica tem sido importante para caracterizar anticorpos produzidos durante a infecção por HIV (ESCOLANO; DOSENOVIC; NUSSENZWEIG, 2010; MOUQUET et al., 2010) e pode ser utilizada para várias outras infecções (dengue, malária, zika vírus, entre muitas outras). No ano de 2013, Muellenbeck e colaboradores, empregaram essa metodologia para *Plasmodium falciparum*, utilizando antígeno GMZ2 para identificar a presença de células B de memória em indivíduos infectados e a capacidade de neutralização de anticorpos monoclonais contra essa proteína em ensaios de inibição de invasão em cultura de parasitas.

Em relação a *P. vivax*, sabe-se que indivíduos com altos níveis de anticorpos inibitórios anti-PvDBPII normalmente são cepa-transcendentes (KING et al., 2008), sugerindo que esses anticorpos reconheçam epítomos conservados na proteína, capazes de gerar imunoglobulinas amplamente neutralizantes. É notório que anticorpos hábeis em anular a ligação antígeno-anticorpo são essenciais para imunidade protetora contra patógenos altamente polimórficos, como HIV ou o vírus influenza (HALPER-STROMBRTG; NUSSENZWEIG, 2016). Expressar em laboratório e caracterizar o perfil desses anticorpos inibitórios cepa-transcendentes anti-PvDBPII pode fornecer informações importantes para estudos envolvendo o desenvolvimento de vacinas para essa espécie.

Nesta tese, utilizamos a estratégia da equipe do Michel Nussenzweig para obter a partir de células B de memória, anticorpos monoclonais contra PvDBP de indivíduos naturalmente expostos à malária na Amazônia brasileira.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi investigar se anticorpos naturalmente adquiridos contra a região II de PvDBP reduzem o risco de malária vivax em uma população rural amazônica exposta a níveis relativamente baixos de transmissão de malária. Com base nisso, os objetivos específicos foram:

1. Caracterizar a resposta de anticorpos contra variantes da região II de PvDBP em uma população sujeita a níveis decrescentes de transmissão da malária.
2. Investigar a diversidade de sequência no domínio II de PvDBP entre os isolados locais de *Plasmodium vivax*.
3. Avaliar se altos níveis de anticorpos contra PvDBP são capazes proteger o indivíduo contra episódios subsequentes de malária vivax.
4. Avaliar se indivíduos com altos níveis de anticorpos naturalmente adquiridos anti-PvDBP são capazes de inibir a ligação entre PvDBP e o antígeno DARC, através de ensaios de inibição de ligação.
5. Verificar a associação entre a presença de anticorpos anti-PvDBPII inibitórios e o risco de malária vivax subsequente.
6. Expressar em laboratório e caracterizar funcionalmente anticorpos monoclonais recombinantes humanos anti-PvDBPII.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Delineamento do estudo

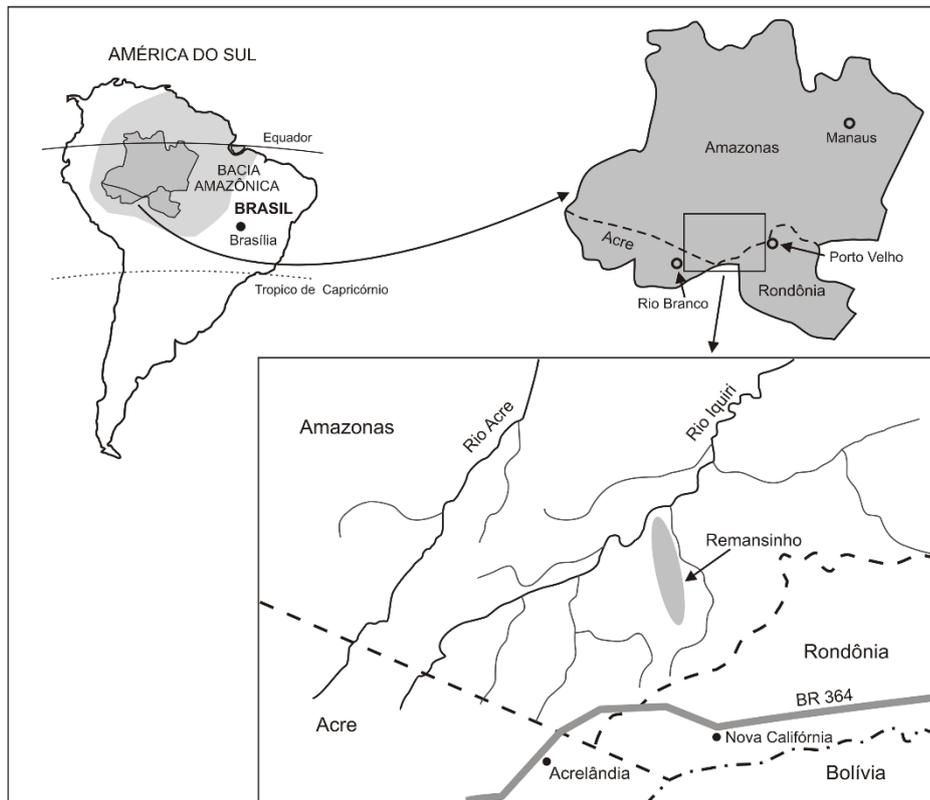
#### 3.1.1 Área de estudo e inquéritos transversais

O estudo foi realizado em cinco assentamentos rurais conhecidos coletivamente como Remansinho, no estado do Amazonas, noroeste do Brasil. Esta área situa-se próximo à fronteira com o Acre, a cerca de 120 km de Acrelândia, a cidade mais próxima (Figura 14). Abrangendo zonas de assentamento agrícola ao redor de uma estrada principal, este estudo se estendeu à população das margens da via principal (Ramal do Remansinho) e de mais quatro vias menores em seu entorno. Essas zonas são denominadas: Ramal dos Goianos, Ramal da Castanheira, Ramal da Linha 1 e Ramal dos Seringueiros. Essa região tem maior índice de pluviosidade entre novembro e março (em média 2318 mm), porém a transmissão de malária ocorre no ano todo. O principal vetor do local é *A. darlingi*.

No total, sete inquéritos transversais foram realizados no local de estudo. Durante o primeiro inquérito (março-maio/2010), todos os habitantes vivendo em dois assentamentos (Ramal do Remansinho e Ramal dos Goianos) foram convidados a participar, enquanto que nos inquéritos posteriores, indivíduos vivendo em outros três assentamentos (Ramal da Linha 1, Ramal da Castanheira e Ramal dos Seringueiros) também foram convidados a participar do estudo.

Foram realizados inquéritos transversais em março-abril/2010, maio-junho/2010, março-abril/2011, outubro-novembro/2011, março-abril/2012, outubro-novembro/2012 e março-abril/2013. Todos os habitantes da área com idade superior a 3 meses de idade foram convidados a contribuir a cada corte com 5 ml de sangue venoso, independente dos sintomas para diagnóstico de malária, ensaios de anticorpos e genotipagem DARC. A cada inquérito transversal foi questionado sobre a presença e intensidade dos sintomas relacionados à malária (febre, calafrios, sudorese, mialgia, dor abdominal, náusea, vômito, tontura, tosse, dispnéia e diarreia) até 7 dias antes da entrevista.

**Figura 14** – Mapa mostrando a localização da área do estudo de campo, Remansinho, sul do estado do Amazonas, na Amazônia Brasileira. O mapa também mostra a vila de Nova Califórnia (oeste do estado de Rondônia), a cidade mais próxima, Acrelândia (leste do estado do Acre), onde se encontrava o laboratório de campo e a BR 364 estrada interestadual, que conecta Acre, Rondônia e o sul do Amazonas com o resto do país.



**Fonte:** Adaptado de Barbosa et al. (2014).

### 3.1.2 Diagnóstico de malária e vigilância

As amostras de sangue colhidas durante os inquéritos transversais foram analisadas para a presença de malária vivax ou falciparum por microscopia de gota espessa (coloração de Giemsa) e diagnóstico molecular quantitativo, através reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) (BARBOSA et al., 2014).

Na microscopia, pelo menos 100 campos foram examinados para parasitas de malária por dois experientes microscopistas, com aumento de 1000x, até que as lâminas fossem consideradas negativas. Para o qPCR, realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular da

Malária, no ICB-USP, foram utilizados *primers* espécie-específicos para amplificar um fragmento de 100 pares de base do gene 18S rRNA de *P. vivax* e *P. falciparum*, com limiar de detecção de 2 parasitas/ $\mu$ L de sangue (GONÇALVES et al., 2012). Para tanto, o DNA genômico de todas as amostras coletadas no estudo foi extraído a partir de 200  $\mu$ L de sangue total, com o kit comercial QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), em plataforma automatizada de extração de DNA/RNA QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Os inquiridos foram complementados com a vigilância clínico-laboratorial feita por profissionais de saúde locais para estimar mensalmente a incidência de malária clínica. Foram registradas todas as infecções confirmadas laboratorialmente em indivíduos do estudo, com base em busca ativa ou passiva de casos febris, entre março de 2010 a outubro de 2013. As infecções de malária diagnosticadas por microscopia, independente da presença ou não de sintomas, foram tratados de acordo com o último Guia de Terapêutica de Malária publicado pelo Ministério da Saúde no Brasil (2010).

### 3.1.3 Genotipagem DARC

A genotipagem de DARC dos indivíduos inseridos no estudo foi realizada conforme Kempinska-Podhorodecka et al. (2012). Dois ensaios TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) foram utilizados para genotipar os dois principais polimorfismos de DARC: aquele na região promotora do gene, a substituição de T-33C no fator de transcrição GATA-1 (*rs2814778*), que é específico para eritrócitos e anula a expressão de DARC na superfície das células sanguíneas (alelo FY\*B<sup>ES</sup>), e o polimorfismo G125A (*rs12075*) que define FY\*B e FY\*A, alelo *wild type* e mutado, respectivamente.

Os ensaios contêm oligonucleotídeos e sondas TaqMan<sup>®</sup> VIC e FAM, que apresentam fluorescências nos alelos 1 e 2, diferindo de acordo com a sonda utilizada: para a mutação na região promotora -33 T  $\rightarrow$  C, o alelo 1 é representado pela presença do polimorfismo, enquanto que o alelo 2, pela ausência. Para a mutação no éxon 2, o alelo 1 é representado pela presença da base A (Adenina), determinando o FY\*B, enquanto que o alelo 2 pela presença de G (Guanina), determinando o genótipo FY\*A.

Foram realizados ensaios com volume final de 25  $\mu$ L: 12, 50  $\mu$ L de Master Mix, 1,25  $\mu$ L dos ensaios e o restante do volume com DNA de 1 a 20 ng. A reação é realizada no aparelho

StepOnePlus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA) com programa de 95°C por 10 min, 40 ciclos à 92°C por 15 min e 60°C por 1 min.

Os dados de fluorescência foram analisados pelo software StepOne™ Software 2.2.2 (Applied Biosystems) onde foi possível identificar indivíduos homozigotos ou heterozigotos para todas as combinações de alelos.

### 3.2 Antígenos recombinantes

As respostas de anticorpos IgG da população de estudo foram analisadas para oito proteínas de *P. vivax* e uma de *P. falciparum*. Para tanto, foram expressas cinco diferentes variantes do domínio II (resíduos 211-525) de *Duffy binding protein* (DBP), incluindo a cepa Salvador I (PvDBP Sal I) e quatro variantes originalmente encontradas em Papua Nova Guiné (nomeadas como PvDBP O, P, C e AH) (COLE-TOBIAN et al., 2009).

Além dessas proteínas, foram avaliadas as respostas de anticorpos contra a região C-terminal, de 19 kDa da proteína de superfície de merozoíto (MSP) 1, conhecida como PvMSP-1<sub>19</sub> (cepa Belém, gentilmente cedida por Dr. Anthony Stowers [NIAID, National Institutes of Health, Estados Unidos]), o bloco II (resíduos 1246-2058) de MSP-3 $\alpha$  de *P. vivax* (PvMSP-3 $\alpha$ ) amplificada da cepa Belém (LIMA- JUNIOR et al., 2011), a região N-terminal (resíduos 34-193) de MSP-9 de *P. vivax* (PvMSP-9) cepa Belém, cedida por Mary Galinski (Emory University, Estados Unidos); e uma única proteína de *Plasmodium falciparum*, a região F2 do antígeno de ligação ao eritrócito de 175 kDa (PfEBA-175), cedida pelo Dr. Chetan Chitnis do International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Índia (atualmente vinculado ao Instituto Pasteur de Paris).

Todas as proteínas utilizadas nesse trabalho foram expressas em *Escherichia coli*, com cauda de histidina. As proteínas recombinantes derivadas de PvDBP passaram por um processo complexo de redobramento, a fim de que mantessem a conformação tridimensional semelhante a encontrada em uma proteína nativa. O protocolo que descreve as etapas de síntese desses antígenos foi descrito por Singh et al. (2001).

Essas proteínas foram conjugadas com microesferas específicas e utilizadas nos Ensaio multiplex baseados em microesferas para detecção de anticorpos.

### 3.3 Conjugação das microesferas para ensaio sorológico

Microesferas carboxiladas xMAP (Luminex, Austin, Texas, Estados Unidos) acopladas a cada antígeno testado (PvDBP [variantes O, P, AH, Sal I e C], PvMSP-1<sub>19</sub>, PvMSP-3 $\alpha$ , PvMSP-9 e PfEBA-175) foram utilizadas para detectar anticorpos IgG específicos contra essas proteínas.

Para tanto,  $6,125 \times 10^5$  microesferas foram centrifugadas (14000 *g* durante 4 minutos, para essa e todas as centrifugações a seguir) para a retirada do líquido de armazenamento e ressuspendidas em 100  $\mu$ L de água deionizada, então foram vortexadas por 10 s, sonicadas pelo mesmo período, novamente centrifugadas e o sobrenadante cuidadosamente retirado. Então, as microesferas receberam 1 mL de fosfato de sódio monobásico a 100 mM, pH 6.2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Os microtubos foram vortexados, sonicados, centrifugados e após a retirada dos sobrenadantes, 10  $\mu$ L de Sulfo-NHS a 50 mg/mL (Sigma-Aldrich) e 10  $\mu$ L de EDC a 50 mg/mL (Sigma-Aldrich) foram adicionados e vortexados vagarosamente. Após esses procedimentos, os microtubos foram incubados por 20 minutos a temperatura ambiente, no escuro, sob rotação. Então, as microesferas foram centrifugadas, os sobrenadantes retirados e as microesferas lavadas 2 vezes com 500  $\mu$ L de PBS 1 x (tampão fosfato-salino: 137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 nM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 nM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), novamente aspiradas e centrifugadas. Após a retirada dos sobrenadantes, cada microtubo contendo as microesferas ativadas receberam cada um uma das proteínas descritas em 3.2, na concentração de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L e o volume final foi completado com tampão PBS pH 7.4 (Sigma-Aldrich) até obtenção de 250  $\mu$ L. O processo de acoplamento ocorreu durante a noite, em sala escura a 4 °C, sob rotação. No dia seguinte, as microesferas foram centrifugadas, lavadas, ressuspendidas por 3 vezes com 500  $\mu$ L PBS-TBN (PBS, 0,1% BSA, 0,02% Tween-20, 0,05% azida sódica, pH 7,4) vortexadas e sonicadas a cada lavagem. No final, após a última aspiração do sobrenadante, as microesferas acopladas aos antígenos de interesse foram ressuspendidas na concentração final de  $5 \times 10^6$  microesferas/mL e armazenadas em microtubos escuros protegidos da luz, sob refrigeração (4 °C) até o uso.

Todas as microesferas conjugadas foram testadas e sua eficiência foi comprovada através de *pool* de soros de adultos de Papua Nova Guiné, infectados com malária causada

por *P. vivax*. Vinte indivíduos norte-americanos nunca expostos à malária foram utilizados como controles negativos.

### 3.4 Ensaio multiplex baseado em microesferas para detecção de anticorpos

Para a realização do ensaio sorológico em sistema Luminex, os plasmas testados foram centrifugados a 14000 *g* durante 10 min sob refrigeração (4 °C), depois diluídas a 1:100 com PBT (1 x PBS pH 7.4, 1% BSA e 0,05% de *Tween*) em placa de diluição contendo 96 poços e colocadas no agitador durante 15 minutos. As microesferas conjugadas foram aliquoteadas e diluídas em um único tubo de 15 mL com PBT 0,05%, de forma que em cada poço com plasma foram adicionadas 500 microesferas acopladas de cada antígeno. Plasmas e microesferas foram distribuídos em placas de 96 poços MultiScreen<sub>HTS</sub>-BV Filter, modelo MSBVN1210 (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) na proporção de 1:1, com volume final de 100 µL/poço e agitados por 30 minutos em temperatura ambiente, protegidos da luz. O plasma de cada indivíduo, após as duas diluições (a primeira com PBT e a segunda com as microesferas), atingiu diluição final de 1:200. Para detectar a ligação do anticorpo nas microesferas, após a incubação e três lavagens com PBT foi adicionado em cada poço anticorpo anti-IgG humano marcado com a R- phycoerythrin (PE) (Jackson Immuno Research, West Grove, Pensilvânia, Estados Unidos) na concentração de 1:100 (diluído com PBT) e então, as placas foram colocadas em agitador por 15 minutos. As microesferas acopladas com anticorpos contra as variantes e o anticorpo secundário, foram novamente lavadas por três vezes com PBT, ressuspensas em 100 µL/poço de PBT e deixadas sob agitação, em temperatura ambiente, até o momento da leitura em sistema Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos).

Como controle positivo foi utilizada uma curva de diluição com plasmas de indivíduos adultos infectados de Papua Nova Guiné, iniciando-se na diluição de 1:50 até 1:6400. Plasmas de 20 controles norte-americanos nunca expostos à malária foram utilizados como controles negativos.

Os resultados foram expressos em medianas de intensidade de fluorescência (MFI) em equipamento Bio-Plex 200 com software Bioplex Manager 6.1 (Bio-Rad). Foram detectadas a fluorescência de no mínimo 75 microesferas por antígeno. O valor de corte (*cut-off*) utilizado

para definir resultados positivos correspondeu a média de MFI dos controles negativos para cada antígeno acrescida de 3 desvios-padrão. Resultados quantitativos foram expressos em índices de reatividade, correspondentes ao valor de MFI da amostra dividido pelo valor de *cut-off*. Amostras com índice >1 foram consideradas positivas.

### 3.5 Sequenciamento da região II de PvDBP

Para determinar se variantes de PvDBP na área de estudo diferem daquelas expressas como antígenos recombinantes foram sequenciados o domínio II de PvDBP (nucleotídeos 870-1545) de 46 isolados locais coletados entre 2010 e 2011. Esses 675 pb foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme protocolo descrito por Souza et al., 2006, utilizando Taq DNA Platinum high-fidelity (Invitrogen, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos) e posteriormente sequenciados.

Para tanto, o DNA genômico de amostras confirmadas como positivas para *P. vivax* por qPCR foram extraídos a partir de 200 µL de hemácias infectadas através do kit comercial QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) em plataforma automatizada de extração QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Foram necessárias duas reações de amplificação, sendo a segunda realizada a partir do produto da primeira PCR. A reação primária teve como volume final de 20 µL, a partir do mix: Tampão 10x High Fidelity PCR, dNTP (0,2 mM), MgSO<sub>4</sub> (2 mM), Primer Mix (0,2 µM), Taq High Fidelity Platinum (1 unidade) e 3 µL de DNA.

Todas as PCRs e sequenciamentos foram realizados em termociclador automático (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems) e o programa utilizado nas duas reações de amplificação foi 94 °C por 2 minutos, 36 ciclos de 94 °C – 30 segundos, 55 °C – 30 segundos, 68 °C – 1 minuto e 15 °C – ∞.

Para a segunda PCR foram utilizados os mesmos primers assim como mesmo mix, porém o volume final de 50 µl. Os iniciadores das amplificações e sequenciamento da região II da molécula de PvDBP, foram descritos por Souza et al. (2006): **Forward**: 5' – ATGTATGAAGGAAGTACGAAT – 3' e **Reverse**: 5' – ACCTGCCGTCTGAACCTTTT – 3'.

Após a segunda reação foi feito um gel de agarose a 1% e os fragmentos visualizados em luz ultravioleta. As amostras que apresentaram bandas específicas para PvDBP (675 pb), foram tratadas através do sistema de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE

Healthcare Life Science, Amersham Place, Little Chalfont, Inglaterra) conforme recomendações do fabricante e quantificadas.

O sequenciamento das amostras amplificadas e purificadas foi realizado utilizando o tampão Big Dye Termination v3.1 Cycle Sequence mixture (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). As reações foram feitas em placa de 96 poços, com volume final de 10 µl/poço, contendo: ~ 100 a 200 ng de DNA, Primer (3,3 µM), Tampão Save Money (3,25 µL) e *Big Dye Terminator* (0,75 µL). O programa utilizado no termociclador foi 96 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 96 °C – 15 segundos, 50 °C – 15 segundos, 60 °C – 4 minutos e 15 °C – ∞.

Após o sequenciamento, o DNA foi precipitado adicionando-se 90 µL de isopropanol a 66%. O homogeneizado foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente, protegido contra luz e centrifugado a 2464 g por 60 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e o sedimento lavado com 150 µL de isopropanol a 75%/poço. A placa foi então centrifugada a 2464 g durante 30 min, o sobrenadante descartado e armazenada a - 20 °C. Após essas etapas, o produto foi levado ao sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). A identificação dos polimorfismos de base única (SNPs) foi feita a partir do alinhamento das sequências utilizando o programa ClustalX 2.1 (LARKIN et al., 2007). No programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL et al., 1999) foi realizada a edição manual do sequenciamento. A cepa de referência utilizada foi Sal I (El Salvador, número de acesso: M61095). As sequências nucleotídicas foram analisadas e comparadas através do MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

As sequências obtidas nesse estudo foram depositadas no GenBank, sob o número de acesso KP036999 – KP037006.

### **3.6 Ensaio de inibição de ligação baseado em microplaca**

Os ensaios funcionais de inibição de ligação de PvDBP em DARC foram realizados conforme descritos por Grimberg et al. (2007) e Shakri et al. (2012).

Para tanto, foi utilizada uma proteína solúvel recombinante contendo o gene que codifica os aminoácidos 1-60 da região N-terminal da proteína humana DARC fusionado a uma sequência que codifica a região Fc da IgG humana, conforme descrito em Shakri et al. (2012). Essa proteína chamada de nDARC-Fc é resultado da co-transfecção em linhagem de células HEK293H com o plasmídeo pCDM8-DARC- Fc e pRc/CMV-TPST, que contém o gene para

sulfotransferase humana. Quatro dias após a transfecção, a proteína recombinante foi purificada do sobrenadante utilizando kit Hitrap protein G column (GE Healthcare). A pureza da proteína foi controlada através de coloração de azul de Coomassie em SDS-PAGE e a concentração estimada em equipamento Nanodrop.

Para os ensaios foram utilizadas microplacas Immulon 2B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) de 96 poços. A cada experimento foi adicionado 12,5 ng/poço de nDARC-Fc diluída em tampão de carbonato -bicarbonato a 50 mM (pH 9.6), incubadas durante a noite, a 4 °C e bloqueadas no dia seguinte com 180 µL/poço de 2% BSA diluído em PBS. A proteína recombinante da região II de PvDBP, Sal I (na concentração de 0,011 µg/mL) foi pré-incubada com amostras de plasmas dos indivíduos do estudo na diluição de 1:20 por 30 minutos. Em seguida, o plasma diluído em contato com PvDBP II Sal I foi transferido (50 µL/poço) para a placa sensibilizada com nDARC-Fc e mantidas sob agitação por 1h em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBST (PBS com 0,05% de Tween) a ligação de PvDBP à DARC foi detectada através da adição de 50 µL/poço de anticorpo policlonal anti-PvDBP Sal I de soro de coelho (na diluição de 1:5000), por 1h a 37 °C, seguido de três lavagens com PBST e acréscimo de 50 µL/poço de anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugada a peroxidase (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos), na diluição de 1:5000, por 1h, em temperatura ambiente e sob agitação. Para melhor entendimento, a Figura 15 ilustra o Ensaio de inibição de ligação baseado em microplaca.

Como controle positivo foram utilizados anticorpos monoclonais humanos anti-PvDBP Sal I em diferentes concentrações (80 ng/mL, 60 ng/mL e 40 ng/mL). Amostras de plasma de indivíduos norte-americanos nunca expostos a malária foram os controles negativos.

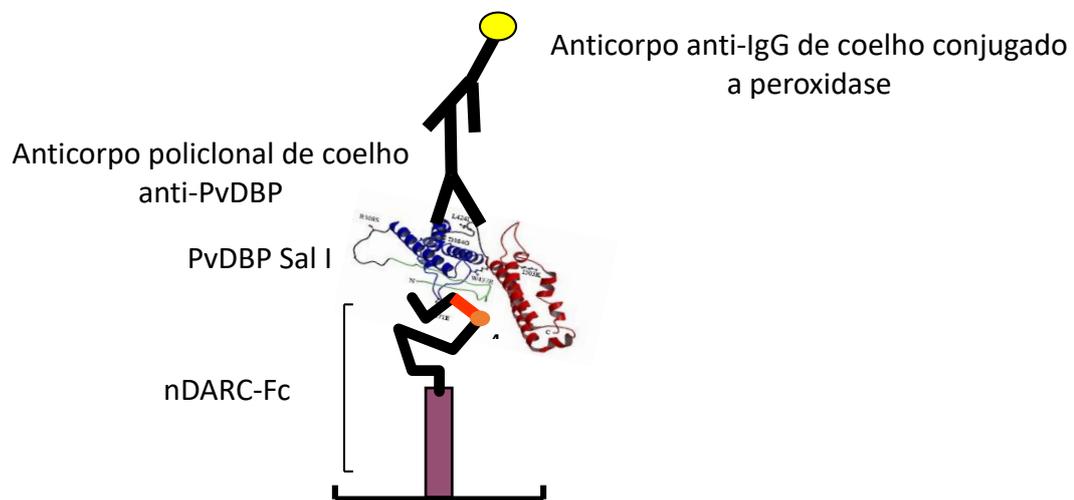
A revelação do ensaio foi feita adicionando 50 µL/poço de TMB (Bio Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) em cada poço. A reação foi interrompida após 20 minutos com a adição de de ácido sulfúrico diluído a 10%. As placas tiveram suas absorbâncias obtidas em leitor de ELISA a 450 nm.

A porcentagem de inibição de ligação foi calculada através da fórmula:

$$\left( 1 - \frac{\text{Absorbância amostra} - \text{background}}{\text{Absorbância controles} - \text{background}} \right) \times 100$$

Para avaliar a especificidade dos anticorpos inibitórios, foram testadas amostras de plasma diluídas (de 1:20 até 1:640) de participantes selecionados do estudo e controles não-expostos para sua habilidade em inibir a ligação de 3 proteínas recombinantes de PvDBP (variantes Sal I, P e C) e nDARC-Fc. O *end-point* dos anticorpos bloqueadores foi definido como a mais alta diluição de plasma em que um atividade bloqueadora-inibitória  $\geq 80\%$  pode ainda ser detectada.

**Figura 15** – Representação do Ensaio de inibição de ligação baseado em microplaca. A placa de 96 poços foi previamente sensibilizada com nDARC-Fc.



**Nota:** O plasma a ser testado foi pré-incubado com a variante da região II de PvDBP, Sal I e após 30 minutos, adicionados ao poço com nDARC-Fc. Após lavagens foi inserido anticorpo de coelho anti-PvDBP, em seguida, anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (representado pelo anticorpo com círculo amarelo). Caso o plasma possuísse anticorpos que inibissem a região II de PvDBP Sal I, o poço-teste não apresentaria cor, pois o anticorpo e a proteína seriam descartados nas lavagens. Se o plasma não possuísse anticorpos capazes de inibir a ligação entre PvDBP e nDARC-Fc, então o poço-teste apresentaria cor, através da reação do anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase e TMB.

### 3.7 Coleta das células mononucleares periféricas

A partir dos resultados dos ensaios de inibição de ligação em microplaca foram selecionados indivíduos (com mais de uma amostra testada) que mantiveram a capacidade de inibição de ligação superior ou igual a 80% em todas as amostras testadas, ou seja, indivíduos com anticorpos de alta atividade inibitória contra a variante PvDBP Sal I, para a coleta de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC). Em uma prévia verificação de

permanência desses indivíduos na área pela equipe de campo, constatou-se que sete deles ainda permaneciam na região e então foi realizada a coleta de sangue periférico dos mesmos.

A finalidade da coleta das PBMCs de indivíduos com anticorpos de alta atividade de inibição de ligação entre PvDBP-DARC foi o desenvolvimento de anticorpos monoclonais *in vitro*, a partir de uma metodologia descrita por Wardemann e Kofer (2013) e realizada pela equipe de Christopher King, da Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, Estados Unidos.

De cada indivíduo selecionado foram coletados 80 mL de sangue total em tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante, para a obtenção das PBMCs e plasma.

### *3.7.1 Processamento das células sanguíneas mononucleares periféricas*

Após a coleta, o sangue foi diluído na proporção de 1:1 em solução de Hanks (Sigma-Aldrich) e centrifugado a 500 *g*, durante 17 minutos em gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare) na proporção de 2:1. A seguir, o anel de células mononucleares obtido do gradiente de densidade foi coletado e submetido a duas lavagens sequenciais com tampão salino-Hanks (Sigma-Aldrich), seguidas de centrifugação a 300 *g* por 10 minutos. O sedimento de células foi ressuscitado em meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Escócia, Reino Unido) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil), HEPES (10 mM) (Gibco), piruvato de sódio (1 mM) (Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM) (Gibco), penicilina/estreptomicina/anfotericina B (1%) (Gibco) e 2-mercaptoetanol (55  $\mu$ M) (Gibco). A viabilidade celular foi averiguada, utilizando-se azul de Trypan (0,04%) e o número de células estimado em câmara hemocitométrica de Neubauer (diluição 1:20). As amostras então foram congeladas a -70 °C, em solução contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich) e 90% de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab) em uma concentração de  $10^7$  células/mL. Os tubos contendo PBMCs foram mantidos a -70 °C durante 24 horas e em seguida criopreservados e transportados em nitrogênio líquido até o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e em gelo seco até a Case Western Reserve University, Cleveland, OH, Estados Unidos, onde foram realizados parte dos experimentos descritos a seguir.

### 3.8 Produção de anticorpos monoclonais anti-PvDBP

#### 3.8.1 FACS sorting de células B específicas

As PBMCs foram descongeladas durante 3 minutos em banho-maria a 37 °C e transferidas para meio RP10 aquecido (RPMI1640 e 10% de soro fetal bovino), com 200 µL de DNAase do tipo 1 para cada 10 mL de RP10. Após centrifugação de 300 g durante 8 minutos, a temperatura ambiente e posterior aspiração do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 10 mL de tampão MACS refrigerado (pH 7.2 [sem cálcio ou magnésio], 0,5% de BSA e 2mM de EDTA). Para a retirada de aglomerados celulares foi utilizado Falcon® Cell Strainer de 30 µm (BD Bioscience, San Jose, CA, Estados Unidos). Nesse momento, as células foram contadas em câmara de Neubauer.

As células então foram centrifugadas a 4 °C, 300 g por 8 minutos, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado ressuspendido em 40 µL de tampão MACS para cada 10<sup>7</sup> células. O isolamento de células B foi realizado através do uso do kit B Cell Isolation Kit II human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Para cada 10<sup>7</sup> células, foram adicionados 10 µL do *cocktail* de anticorpos monoclonais biotinilados (presentes no kit) contendo anticorpos conjugados contra CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 e CD235a. Esse *cocktail* de anticorpos foi misturado com as células ressuspendidas em tampão MACS, homogeneizado e incubado por 5 minutos a 4 °C. Após esse período, 20 µL de *microbeads* anti-biotina para cada 10<sup>7</sup> células foram adicionadas e incubadas com as células sob refrigeração durante 10 minutos. O volume foi completado para 1000 µL com tampão MACS e transferido a uma coluna MS MACS (Miltenyi Biotec), em sistema MACS de separação magnética, previamente lavada com tampão MACS. As células foram aplicadas na coluna magnética e após sua passagem, a coluna foi lavada por 3x com 500 µL tampão MACS e todas as células não marcadas foram recolhidas em tubo Falcon® de 15 mL. Foram adicionados 10 mL de PBS 1 x refrigerado e as células centrifugadas a 4 °C, 300 g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 500 µL de PBS, as células contadas em câmara de Neubauer (diluídas 1:1 com Azul de Trypan) e mantidas a 4 °C até que o mix de colorações estivesse pronto para a finalização do experimento.

Simultaneamente a esse processo, foi realizado o preparo da proteína PvDBP Sal I biotinilada conjugada com estreptavidina-APC (Thermo Fisher Scientific). Para tanto, foram necessários 1,64 µg da proteína e 1,5 µg de SA-APC (estreptavidina conjugada a APC).

Brevemente, a proteína PvDBP Sal I foi adicionada em microtubo protegido da luz, junto com 0,3 µL de SA-APC. O tubo foi homogenizado e colocado em repouso por 10 minutos. Então, mais uma alíquota de SA-APC foi adicionada (0,3 µL) e o tubo homogeneizado após 10 minutos de repouso. SA-APC foi adicionada mais três vezes, com uma diferença de 20 minutos entre cada e sempre homogenizando a cada 10 minutos. Ao final desse processo, adicionaram-se 37 µL de PBS para atingir a concentração de 0,04 µg/µL e a proteína foi centrifugada a 12000 *g* durante 6 minutos, 4 °C. A proteína conjugada SA-APC+PvDBPII foi armazenada em sala refrigerada e protegida da luz até o seu uso.

As células B mantidas em refrigeração após a contagem foram distribuídas em 3 tubos: o primeiro, sem adição de anticorpos com fluorocromos, recebeu 50.000 células, 100 µL de tampão FACS (2% soro fetal bovino, 0,05% de azoteto de sódio, 2 mM de EDTA em PBS). Ao segundo tubo, foram adicionadas 120.000 células, 89 µL de tampão FACS, 3,5 µL de anticorpo anti IgG-humana conjugada a PE-Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 5 µL de anti-CD20 conjugada a PE-Cy5.5 (BD Biosciences) e 0,5 µL de *Sytox Green Dead Cell Stain* (Invitrogen) para a marcação de células mortas. No terceiro e último tubo, todas as células restantes foram misturadas a 81 µL de tampão FACS, 3,5 µL de IgG anti-humana conjugada a PE-Cy7 (BD Biosciences), 5 µL de anti- CD20 conjugada a PE-Cy5.5 (BD Biosciences), 6 µL de SA-APC+PvDBPII e 0,5 µL de Sytox Green. Todos os tubos permaneceram durante 30 minutos no escuro, à temperatura de 4 °C. Após esse período foram lavados com 2 mL de tampão FACS, centrifugados a 4 °C, 300 *g* por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 300 µL de tampão FACS e armazenado a 4 °C, protegido da luz, até a leitura no citômetro.

Para a compensação da leitura de citometria foram preparados 5 tubos: o de compensação para IgG foi preparado com 200 µL de tampão FACS, uma gota de *beads* anti- Ig de camundongo positiva (BD Bioscience) e 4 µL de IgG-PE-Cy7 (BD Biosciences). Para a compensação de CD20, além de 200 µL de tampão FACS foi adicionado também uma gota de *beads* anti- Ig de camundongo positiva (BD Bioscience) e 4 µL de CD20 PE- Cy5.5 (BD Biosciences). Já no tubo de compensação para proteína PvDBP Sal I, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-PvDBP, nomeado 3D10 (NTUMNGIA et al., 2012). Para esse tubo, foram adicionado 100 µL de tampão FACS, 6 µL do monoclonal 3D10 na concentração de 6 µg e 6 µL de SA-APC+PvDBPII. A diferenciação de PBMCs mortas e vivas foi obtida com 30.000 células mortas através de aquecimento em termociclador a 90 °C, durante 5 minutos e à essas células

foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão FACS e 0,5  $\mu$ L de *Sytox Green Dead Cell Stain* (Invitrogen). Para finalizar, o controle negativo foi feito adicionando 200  $\mu$ L de tampão FACS e uma gota de *beads* anti- Ig de camundongo negativa (BD Bioscience). Todos os tubos de compensação foram incubados a 4 °C, no escuro, por 30 minutos.

Após o período de coloração, os controles foram lavados com 2 mL de tampão FACS, centrifugados a 4 °C, 300 *g* durante 8 minutos e o sobredanadante foi descartado. O precipitado foi vortexado brevemente e ressuspenso em 300  $\mu$ L de Tampão FACS para leitura em equipamento BD FACSAria II (BD Bioscience). As análises foram realizadas utilizando-se o software *FlowJo* (TreeStar, Ashland, OR, Estados Unidos).

A Tabela 1 lista os anticorpos conjugados aos fluorocromos, coloração de DNA, forma de separação magnética das células B de outros tipos celulares e a proteína conjugada utilizada para *sorting* dos experimentos realizados.

**Tabela 1** – Descrição das amostras, tipo de separação magnética e colorações que foram utilizadas na citometria e *sorting*.

Datas/aparelho	Amostras	Filtro	Separação magnética	Colorações
12/Out/2015 01/Dez/2015 <b>FACSAriaII sort</b>	208 e 53, Brasil	695/40	B Cell Kit II	IgG PE-Cy7, CD20+PE-Cy5.5, Sytox Green LIVE/DEAD, APC-PvDBPII

Antes de acomodar as células B selecionadas no processo de *sorting*, cada poço da placa de 96 poços recebeu 4  $\mu$ L do tampão de captura que contém 3,46  $\mu$ L de água; 0,30  $\mu$ L de RNAsin (40 U/ $\mu$ L – Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos); 0,20  $\mu$ L de PBS 10x e 0,04  $\mu$ L de 1M DTT (Ditiotreitol). As placas foram armazenadas a 4 °C até ser realizada a captura das células.

O *sorting* de células B que reconhecem a região II da variante de PvDBP Sal I foi realizado com as amostras de registro 208 e 53.

Após o *sorting*, as placas contendo as células B foram seladas, identificadas e armazenadas a -80 °C até a síntese de cDNA das mesmas.

### 3.8.2 Síntese de DNA complementar das células B

Para iniciar o trabalho de produção de anticorpos monoclonais em laboratório foram feitas sínteses de DNA complementar (cDNA) das células B oriundas do *sorting*. Para tanto, cada poço da placa que continha uma célula B isolada, recebeu 5,07 µL de água *RNAase free* (Roche, Indianápolis, Indiana, Estados Unidos), 1 µL de Random Hexamers na concentração de 300 ng/ µL (Operon Technologies, Alameda, Califórnia, Estados Unidos), 0,63 µL de NP-40 a 10% (ThermoFisher Scientific) e 0,30 µL de RNAsin (40 Units/µL) (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), totalizando o volume de 7 µL. Cada poço foi “lavado” com esse mix, através de dezenas de pipetagens em circular com pipeta multicanal, tocando as bordas de cada poço, aspirando e liberando o conteúdo, para certificar que todo o RNA estivesse presente no mix da reação. Todo o processo de pipetagem foi realizado a 4 °C, então a placa foi selada e centrifugada a 4 °C, 1200 *g* durante 1 minuto. O próximo passo foi colocá-la em termociclador a 68 °C durante 5 minutos e a 4 °C durante 1 minuto. Então a placa foi centrifugada novamente, armazenada a 4 °C e um novo mix de reação foi preparado.

O segundo passo para a síntese de cDNA foi realizado através da preparação de 7µL/poço de mix contendo: 2,22 µL de de água *RNAase free* (Roche), 3, 60 µL de tampão 5 x RT (ThermoFisher Scientific), 0,62 µL de dNTPs (25 mM cada), 0,25 µL de RNAsin (40 Units/µL) (Promega) e 0,31 µL de enzima Maxima RT (ThermoFisher Scientific). Após cada poço receber o mix descrito, a placa foi selada e colocada em termociclador com a seguinte programação:

Temperatura	Tempo
42 °C	5 minutos
25 °C	10 minutos
50 °C	60 minutos
94 °C	5 minutos
4 °C	∞

A placa contendo cDNA foi retirada do termociclador imediatamente após o ciclo de temperaturas ser completado e então, 10 µL de água deionizada foram adicionados em cada poço. A placa de cDNA durante manipulação foi mantida sempre a 4 °C e armazenada a -20 °C

até o uso. Durante sua síntese, o mix da primeira PCR foi preparado, a fim de minimizar o tempo de exposição e consequente degradação do cDNA.

### *3.8.3 Amplificação das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas*

Foram realizadas duas reações em cadeia da polimerase (*nested PCR*) para amplificação das cadeias leves (kappa e lambda) e pesadas (gamma) das imunoglobulinas de cada poço de cDNA. O volume de cDNA utilizado na primeira PCR foi de 2 µL e para a segunda, 4 µL do produto da primeira.

Para a primeira reação, cujo volume final foi de 20 µL, foram utilizados por poço: 15,58 µL de água RNase free (Roche), 2 µL de tampão 10 x HotStar Taq PCR (Qiagen), 0,20 µL de dNTP mix (25 mM de cada dNTP), 0,065 µL do mix de oligonucleotídeos 5' (descritos na Tabela 2), a mesma quantidade do oligonucleotídeo 3' correspondente e 0,09 µL Taq DNA polymerase (5 unidades/µL - HotStar Quiagen). Os primers foram utilizados na concentração de 50 µM (para a formação do mix de cada grupo foram utilizados 50 µM de cada) e suas sequências de nucleotídeos são de acordo com a cadeia da imunoglobulina a ser amplificada, como mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2** – Conjunto de oligonucleotídeos utilizados na primeira PCR das cadeias das imunoglobulinas

<b>Ig<math>\gamma</math> (IgH – cadeia pesada)</b>		
<b>5' LVH Mix</b>	5'L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
	5'L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
	5'L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
	5'L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG
	3'C $\gamma$ CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC
<b>Ig<math>\kappa</math> (IgG kappa – cadeia leve)</b>		
<b>5' Lvkappa Mix</b>	5' L V $\kappa$ ½	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
	5' L V $\kappa$ 3	CTCTTCCTCTGCTACTCTGGCTCCCAG
	5' L V $\kappa$ 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG
	3' C $\kappa$ 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA
<b>Ig<math>\lambda</math> (IgG lambda – cadeia leve)</b>		
<b>5' LVLambda Mix</b>	5' L V $\lambda$ 1	GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG
	5' L V $\lambda$ 2	GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG
	5' L V $\lambda$ 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG
	5' L V $\lambda$ 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG
	5' L V $\lambda$ 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG
	5' L V $\lambda$ 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG
	5' L V $\lambda$ 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG'
	3' C $\lambda$	CACCAGTGTGGCCTTGTGGCTTG

Para a segunda amplificação, o volume final da reação foi 40  $\mu$ L. Para tanto, foram utilizados por poço: 31,16  $\mu$ L de água RNase free (Roche), 4  $\mu$ L de Tampão 10 x HotStar Taq PCR (Qiagen), 0,40  $\mu$ L de dNTP mix (25 mM de cada dNTP), 0,13  $\mu$ L do mix de oligonucleotídeos 5' (descritos na Tabela 3), a mesma quantidade do oligonucleotídeo 3' correspondente e 0,18  $\mu$ L Taq DNA polymerase (5 unidades/ $\mu$ L - HotStar Quiagen). O conjunto de oligonucleotídeos utilizados na segunda PCR estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** – Conjunto de oligonucleotídeos utilizados na segunda PCR das cadeias das imunoglobulinas

<b>Ig<math>\gamma</math> (Ig gamma – cadeia pesada)</b>		
5' AgeVH Mix	5' AgeI VH 1	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG
	5' AgeIVH 1/5	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG
	5' AgeI VH 3	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG
	5' AgeI VH 3-23	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG
	5' AgeIVH 4	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
	5' AgeIVH 4-34	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGT
	3' IgG (internal)	GTTCGGGGAAGTAGTCCTTGAC
<b>Ig<math>\kappa</math> (Ig kappa – cadeia leve)</b>		
	5' Pan V $\kappa$	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG
	3' C $\kappa$ 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
<b>Ig<math>\lambda</math> (Ig lambda – cadeia leve)</b>		
5' AgeVlambda Mix	5' AgeIV $\lambda$ 1	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG
	5' AgeIV $\lambda$ 2	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG
	5' AgeIV $\lambda$ 3	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG
	5' AgeIV $\lambda$ 4/5	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA
	5' AgeIV $\lambda$ 6	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG
	5' AgeI V $\lambda$ 7/8	CTGCT <u>ACCGGT</u> TCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG
	3' XhoI C $\lambda$	CTCCTCA <u>CTCGAG</u> GGGYGGGAACAGAGTG

No termociclador, cada reação foi feita inicialmente por 15 minutos a 94 °C, 50 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57 °C (para cadeias IgH/ Ig $\kappa$ ) ou 60 °C (para Ig $\lambda$ ) por 30 segundos, 72 °C por 55 segundos (na 1ª PCR) ou 45 segundos (na 2ª PCR) e extensão de 72 °C durante 10 minutos.

Após a segunda PCR as amplificações foram verificadas em gel de agarose a 1,2%. O produto da segunda PCR tem tamanho esperado para Ig $\gamma$  de 450bp, 510bp para Ig $\kappa$  e 405bp para Ig $\lambda$ .

Todas as amostras positivas que formaram pares de cadeia pesada/leve foram purificadas utilizando Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) e enviadas para

o sequenciamento, utilizando 30 ng/ $\mu$ L do produto da PCR purificado e oligonucleotídeos a 5  $\mu$ M.

As sequências foram analisadas através do IMGT/V-QUEST (acesso: <http://www.imgt.org>), que fornece a classificação dos segmentos V(D)J de acordo com a maior identidade com as sequências germline, além do número e localização das mutações somáticas. A sequência do CDR3 foi determinada pela contagem dos resíduos de aminoácidos posteriores à região do *framework* 3 até o motivo triptofano-glicina (WG) conservado nas sequências de cadeia pesada ou fenilalanina-glicina (FG) nas sequências de cadeias leves.

Os primers específicos da amplificação de V-GENE foram individualmente desenhados baseados na configuração da V gene *germline* (<http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/index.php>). Esses iniciadores contém o sítio de restrição *AgeI* e os 18 primeiros nucleotídeos da V gene de FWR1, preferencialmente terminando com C ou G. Oligonucleotídeos específicos para J-GENE, contém o sítio de restrição *Sall* para cadeias Igy (pesadas) e *BsiWI* para Ig $\kappa$  (cadeia leve kappa). Os genes da cadeia Ig $\lambda$  foram amplificados usando os respectivos primers 5' listados na Tabela 3 (que contém os sítios de restrição sublinhados) e 3' *XhoI*  $\kappa$ .

As reações específicas foram feitas em placas de 96 poços e em cada poço foi preparado um mix contendo 27,2  $\mu$ L de água RNase free (Roche), 4  $\mu$ L de tampão 10 x HotStar Taq PCR (Quiagen), 0,40  $\mu$ L de mix de dNTP (contendo 25 mM de cada dNTP), 2  $\mu$ L dos oligonucleotídeos correspondentes (na concentração de 5  $\mu$ M cada) descritos na Tabela 4, 0,20  $\mu$ L de Taq DNA polymerase (5 unidades/ $\mu$ L) (HotStar, Quiagen) e 4,2  $\mu$ L do produto da primeira PCR.

No termociclador, a PCR específica iniciou-se com 94 °C durante 15 minutos, 50 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57 °C (para IgH/ Ig $\kappa$ ) ou 60 °C (para Ig $\lambda$ ) por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão de 72 °C durante 10 minutos.

**Tabela 4** – Oligonucleotídeos utilizados para a PCR específica das cadeias das imunoglobulinas.

<b>Ig<math>\gamma</math> específico (Ig gamma – cadeia pesada)</b>	
5' <i>Agel</i> VH1_18	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTTCCAGCTGGTGCAG
5' <i>Agel</i> VH1/5	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG
5' <i>Agel</i> VH1_24	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTCCAGCTGGTACAG
5' <i>Agel</i> VH3_9	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG
5' <i>Agel</i> VH4_34	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG
5' <i>Agel</i> VH3_33	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG
5' <i>Agel</i> VH6_1	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG
5' <i>Agel</i> VH4_39	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAG
3' <i>Sall</i> JH1/2/4/5	TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAGGAGACGGTGACCAG
3' <i>Sall</i> JH3	TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAAGAGACGGTGACCATTG
3' <i>Sall</i> JH6	TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAGGAGACGGTGACCGTG
<b>Ig<math>\kappa</math> específico (Ig kappa – cadeia leve)</b>	
5' <i>Agel</i> Vk 1_5	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTC
5' <i>Agel</i> Vk 1_9	TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCAGACATCCAGTTGACCCAGTCT
5' <i>Age I</i> Vk 1_39	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGACATCCAGATGACCCAGTC
5' <i>Agel</i> Vk 1D_43	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC
5' <i>Agel</i> Vk 2_24	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC
5' <i>Agel</i> Vk 2_28	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATATTGTGATGACTCAGTC
5' <i>Agel</i> Vk 2_30	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATGGGGATGTTGTGATGACTCAGTC
5' <i>Agel</i> Vk 3_11	TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCAGAAATTGTGTTGACACAGTC

**Tabela 4** – Oligonucleotídeos utilizados para a PCR específica das cadeias das imunoglobulinas (conclusão)

5' Agel Vκ 3_20	TTGTGCTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCAGAAATTGTGTTGACGCAGTCT
5' Agel Vκ 4_1	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGTC
3' BsiWI Jκ 1/4	GCCAC <u>CGTACG</u> TTTGATYTCCACCTTGGTC
3' BsiWI Jκ 2	GCCAC <u>CGTACG</u> TTTGATCTCCAGCTTGGTC
3' BsiWI Jκ 3	CTGCA <u>ACCGGT</u> GTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG
3' BsiWI Jκ 5	GCCAC <u>CGTACG</u> TTTAATCTCCAGTCGTGTC

As amostras foram observadas em gel de agarose a 1,2% e aquelas que apresentaram amplificação foram purificadas utilizando Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) e eluídas em 60 µL de água *RNAse free* (Roche).

#### 3.8.4 Digestão, ligação e transformação em células competentes

Sítios de restrição foram introduzidos nos oligonucleotídeos utilizados na PCR específica (sequências sublinhadas nas Tabelas 3 e 4), então os produtos das amostras purificadas foram digeridos por enzimas *Agel/Sall* para as amostras amplificadas de cadeia pesada, *Agel/BsiWI* para cadeia leve kappa ( $Ig\kappa$ ) e *Agel/XhoI*, para cadeia leve lambda ( $Ig\lambda$ ), antes de serem subclonados em plasmídeos.

Para a digestão foram adicionados em microtubos distintos, 4 µL de água *RNAase free* (Roche) e 0,5 µL de tampão 10 x da enzima de restrição correspondente: NEBuffer 4 para as cadeias pesadas e leve ( $Ig\lambda$ ), NEBuffer 1 para cadeia leve kappa ( $Ig\kappa$ ) (New England Biolabs [NEB], Frankfurt, Main, Germany). Então foram adicionadas as enzimas de restrição, sendo: 0,07 µL *Agel*-HF (NEB) para a digestão de todas as cadeias; 0,07 µL de *Sall* - HF (NEB) específica para produto de cadeia pesada e 0,07 µL de *XhoI* (NEB) para a digestão de cadeia leve lambda ( $Ig\lambda$ ). Nesse momento o microtubo destinado a digestão de  $Ig\kappa$  ainda não recebe a segunda enzima de restrição. Junto com 0,3 µL de BSA 100 x (NEB), em todos os tubos foram adicionados 31,5 µL do produto da segunda PCR específica purificado da cadeia a sofrer

digestão e mais 3,5  $\mu\text{L}$  do NEBuffer da enzima correspondente. Essa preparação foi incubada durante 2 horas a 37 °C, em termociclador.

Após esse período, o produto de cadeia Igk recebe a segunda enzima de restrição com a adição de 1,7  $\mu\text{L}$  de água *RNAse free* (Roche), 0,2  $\mu\text{L}$  de NEBuffer 1 (NEB) e 0,1  $\mu\text{L}$  de enzima *BsiWI* (NEB) e por 2 horas foram mantidas a 55 °C, em termociclador.

Todas as amostras digeridas foram purificadas utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) e eluídas em 40  $\mu\text{L}$  de água *RNAse free* (Roche). Ao quantificar os produtos de PCR digeridos deveriam ter 17 a 25 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA.

Então, esses produtos foram subclonados em vetores de expressão Ig $\gamma$ , Igk e Ig $\lambda$ , contendo as regiões constantes humana para IgG1, Igk ou Ig $\lambda$ , respectivamente e gene de resistência a ampicilina.

Cada vetor de expressão foi utilizado na concentração de 50 ng/ $\mu\text{L}$ , juntamente com 1  $\mu\text{L}$  de tampão 10 x T4 DNA ligase (NEB), 0,5  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase (400.000 U/mL) (NEB), 6,5  $\mu\text{L}$  do produto da digestão purificado e água *RNAse free* (Roche) até completar o volume total de 10  $\mu\text{L}$ , se necessário. Para a ligação, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas ou a 16 °C, durante a noite.

Os vetores de expressão contendo os insertos foram transformados dentro de células competentes One Shot Top 10 Chemically Competent *E.coli* (Thermo Fisher Scientific). Para tanto, 8  $\mu\text{L}$  dessas células foram aliqüotadas em microtubos juntamente com 1  $\mu\text{L}$  do produto da ligação e incubados em gelo durante 30 minutos. Após esse período, as células sofreram um choque térmico ao serem colocadas em termociclador a 42 °C durante 40 segundos e então acomodadas novamente em gelo, durante 2 minutos. Cada microtubo contendo células competentes e vetores receberam 180  $\mu\text{L}$  de meio S.O.C. (Thermo Fisher Scientific) e foram mantidos sob agitação a 37 °C, durante 30 minutos. Após essa etapa, as células competentes contendo os vetores de expressão foram semeadas em placas de LB ágar com ampicilina a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (LB Ágar Amp) e mantidas a 37 °C, durante a noite, para o crescimento das colônias.

No dia seguinte, foi realizada PCR utilizando uma colônia para cada poço de uma placa de 96 poços. Para cada tipo de cadeia de imunoglobulina transformada foi utilizado um diferente tipo de oligonucleotídeo 3'. A reação com 25  $\mu\text{L}$  de volume final foi composta por: 21,9  $\mu\text{L}$  de água *RNAse free* (Roche), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10 x HotStar Taq PCR (Qiagen), 0,25  $\mu\text{L}$  de dNTP (25 mM cada dNTP), 0,1  $\mu\text{L}$  de primer 5' Ab sense (50  $\mu\text{M}$ ) (GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC), 0,1  $\mu\text{L}$  do primer específico da cadeia a ser amplificada (50  $\mu\text{M}$ )

(Igy: 3' IgG internal, Igk: 3' Ck494 e Igλ: 3' C Xho lambda, todos encontrados na Tabela 3); 0,125 µL de Taq DNA polymerase (5 unidades/µL - HotStar Quiagen). Cada colônia foi retirada da placa de cultura com ajuda de uma ponteira de 200 µL, semeada em outra placa LB Ágar Amp (para obtenção de colônias reserva) e colocada em contato com o mix da PCR durante alguns minutos. Essas placas de LB Ágar Amp contendo as colônias reserva foram mantidas a 37 °C, durante a noite e então, armazenadas a 4 °C. O ciclo da PCR em termociclador foi iniciado com 94 °C durante 15 minutos, 27 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto, finalizando com 72 °C por 10 minutos.

Todo o produto da PCR de colônia foi verificado em gel de agarose 1,2%, com tamanho esperado de 650 pb para o vetor Igy, 700 pb para Igk e 590 pb para Igλ. Os produtos da PCR amplificados foram purificados utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega), diluídos em 25 µL de água RNase free (Roche) e enviados para sequenciamento (30 ng/µL) utilizando oligonucleotídeos 5' Ab sense a 5 µM.

As sequências das colônias foram analisadas no programa IMGT/V-QUEST (acesso: <http://www.imgt.org>), onde foi possível avaliar sua funcionalidade, semelhanças com a sequência de origem e possíveis contaminações. Para comparar as sequências obtidas dos possíveis clones com a original foi utilizado o programa Mega Clustal (acesso: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Após alinhamento, as sequências que se assemelhavam 100% em relação a sequência de origem foram selecionadas, isoladas individualmente em placas contendo LB ágar Amp e mantidas a 37 °C, durante a noite.

De todas as colônias que cresceram na placa, uma foi selecionada e depositada em 6 mL de meio Luria Bertani (LB líquido - 1g de triptona, 0,5g de extrato de levedura, 1g de NaCl, 100 mL de água destilada), pH 7.0, com 100 µg/mL de ampicilina e mantidas a 37 °C, sob agitação, durante a noite. No dia seguinte, cerca de 400 µL desse meio com colônias foram congelados com glicerol a 25% e armazenados em microtubos a -80 °C. O restante do meio foi utilizado na preparação do miniprep utilizando Kit Axy Prep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, Union City, California, Estados Unidos), conforme instruções do fabricante e quantificados em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

### 3.8.5 Produção de Anticorpos Monoclonais em pequeno volume

Para cada amostra em que foi possível obter colônias de plasmídeos de cadeia pesada (I $\gamma$ ) e sua correspondente cadeia leve (I $\kappa$  ou I $\lambda$ ) foi realizada a transfecção desses plasmídeos em uma linhagem de células embrionárias humanas chamadas HEK293H, para obtenção de uma pequena alíquota desses monoclonais para caracterização inicial.

Para tanto,  $5 \times 10^6$  células HEK293H (ThermoFisher) foram diluídas em meio Gibco® FreeStyle™ 293 Expression Medium (ThermoFisher), sem adição de soro fetal bovino, em placas de 10 cm de diâmetro, atingindo o volume final de 5 mL (logo, a quantidade de células por ensaio foi de  $1 \times 10^6$  células/mL). As células foram transfectadas utilizando-se 5  $\mu$ g dos plasmídeos que codificam as cadeias leve e pesada de cada um dos anticorpos na presença de polietilenimina (PEI) (Sigma). Brevemente, 2,5  $\mu$ g de cada plasmídeo foram adicionados à 500  $\mu$ L DMEM 1 x (Sigma) e filtrados em filtros de 0,22  $\mu$ m. Após breve agitação, 5  $\mu$ g de PEI (Sigma) foram adicionados e submetidos a agitação por 10 segundos, seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. Os plasmídeos foram adicionados a placa contendo as células HEK293H utilizando-se uma pipeta de 1 mL. Após 96 horas em estufa a 37 °C com 8,5% CO<sub>2</sub> e agitação constante, as culturas foram centrifugadas a 300 g durante 5 minutos e o sobrenadante, contendo os anticorpos monoclonais (mAbs) foram coletados por pipetagem, filtrados em filtro de 0,22  $\mu$ m e armazenados a – 20 °C.

### 3.8.6 ELISA para detecção de Imuglobulinas IgG

Os sobrenadantes contendo os anticorpos monoclonais expressos foram testados para a presença de imunoglobulina IgG, através de ELISA. Resumidamente, placas 4HBX Immulon (Thermo Scientific) foram sensibilizadas com 25  $\mu$ L/poço de anti-IgG humana obtida de soro de cabra (Jackson Immuno Research, West Grove, Pensilvânia, Estados Unidos), diluída em PBS a 2  $\mu$ g/mL e mantidas a 4 °C, durante a noite. No dia seguinte, após lavagens com PBST (PBS com 0,05% de Tween), o bloqueio foi realizado durante 1 hora, adicionando-se 100  $\mu$ L/poço de leite em pó desnatado diluído a 0,2% em 2 mM de EDTA e 0,05% de Tween, a temperatura ambiente. Após lavagens com PBST, foram pipetados 25  $\mu$ L/poço de amostras em duplicatas: o sobrenadante resultante da transfecção não diluído e diluído nas concentrações de 1:10 e 1:100. Uma curva-padrão de IgG humana foi adicionada em 4

diluições seriadas com concentração inicial de 300 µg/mL até 0,3 µg/mL. Curvas e amostras foram diluídas em PBS e mantidas durante 2 horas a temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-IgG humana conjugada a peroxidase (HRP; Thermo Scientific) na concentração 0,8 µg/mL, diluída com 2 mM EDTA e 0,05% *Tween* foi adicionada em cada poço (25 µL) e incubada durante 2 horas sob temperatura ambiente. O ensaio foi revelado por adição de 50 µL/poço de tetrametilbenzidina (TMB; Bio-Rad) e a reação foi interrompida com 50 µL/poço de 1% de SDS. As placas tiveram suas absorbâncias obtidas em leitor de ELISA a 410 nm.

Os sobrenadantes contendo os anticorpos monoclonais (positivos para a presença de IgG) foram purificados utilizando Dynabeads Protein G (Thermo Scientific), conforme as instruções do fabricante, e preparados para o ELISA específico da variante Sal-I de PvDBP, a mesma proteína recombinante que foi realizado o *sorting* de células B.

### 3.8.7 ELISA para detecção de anticorpos anti-PvDBP

Placas 4HBX Immunol (Thermo Scientific) foram sensibilizadas com 50 µL/poço de proteína recombinante PvDBP Sal I na concentração de 0,8 µg/mL (diluída em PBS) e mantidas durante a noite a 4 °C. Após lavagens com PBST, as placas foram bloqueadas com 150 µL/poço de BSA a 3% diluído com PBST, durante 1 hora, a 37 °C. Os anticorpos monoclonais purificados foram adicionados em cada poço (50 µL) em duplicatas e incubados a 37 °C por 1h. Após lavagens com PBST foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado a HRP (Thermo Scientific) na concentração de 0,8 µg/mL (diluída a PBS com 1% de BSA e 0,05% de *Tween*) e as placas incubadas durante 1 hora a 37 °C. O ensaio foi revelado adicionando-se 100 µL/poço TMB (Bio-Rad) e a reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico diluído a 10%. As placas tiveram suas absorbâncias obtidas em leitor de ELISA a 450 nm.

### 3.8.8 Produção de Anticorpos Monoclonais em grande volume

Todos anticorpos monoclonais purificados que reconheceram PvDBP Sal I foram produzidos em grande volume para obtenção de alíquotas com alta concentração. Para tanto, uma pequena porção das colônias armazenadas a -80 °C contendo plasmídeos isolados com a

cadeia pesada e leve dos monoclonais de interesse foram acrescentadas separadamente em 500 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de Ampicilina, a 37 °C e deixada sob agitação durante a noite. O maxiprep foi realizado utilizando o kit Quiagen Plasmid Mini, Midi and Maxi kits (Quiagen), conforme instrução do fabricante e a transfecção foi realizada através de  $1 \times 10^6$  células HEK293H/mL diluídas em meio Gibco® FreeStyle™ 293 Expression Medium (ThermoFisher) até o volume final de 100 mL.

As células foram transfectadas utilizando-se 100 µg dos plasmídeos que codificam para as cadeias leve e pesada de cada um dos anticorpos na presença de PEI (Sigma). Brevemente, em um frasco de 50 mL, 50 µg de cada plasmídeo foram adicionados a 10 mL DMEM 1x (Sigma) e filtrados em filtros de 0,22 µm. Após breve agitação, 100 µg de PEI foram adicionados e submetidos a agitação por 10 segundos, seguida de incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. Após essa incubação, o conteúdo do frasco contendo os plasmídeos foi adicionado ao recipiente contendo as células HEK em meio de cultura. Após 96 horas em estufa a 37 °C com 8,5% CO<sub>2</sub>, sob agitação, os sobrenadantes das culturas foram centrifugados a 300 g durante 5 minutos, filtrados em filtro de 0,22 µm e o sobrenadante concentrado 20 vezes utilizando o sistema 50 kDa *cut-off* Vivaflow 50 Systems (Vivascience, Sartorius Corporation, Bohemia, Nova Iorque, Estados Unidos). Os anticorpos monoclonais foram purificados em coluna Protein A HP Hitrap (GE Healthcare), eluídos com IgG binding Buffer (Pierce, Thermo Fisher Scientific) e neutralizados com Tris, pH 9, 1 M. Então foram concentrados e o tampão substituído por PBS usando Amicon Ultra-4 10 KDa (Millipore). A concentração foi determinada em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) e a pureza das amostras analisada por SDS-PAGE.

### **3.9 Caracterização do anticorpo monoclonal anti-PvDBP humano**

#### *3.9.1 Ensaio de inibição de ligação in vitro*

Para testar a funcionalidade dos anticorpos monoclonais produzidos foi realizado ensaio de inibição de ligação *in vitro* entre a proteína PvDBP Sal I e hemácias com genótipo DARC FY\*AFY\*A e FY\*BFY\*B, através de citometria de fluxo.

Resumidamente, 10 µL de hemácias de cada doador foram diluídas em 200 µL de PBS e 4 µL dessas diluições foram adicionadas em poços de placa com 96 poços, de modo que em

cada poço a quantidade de hemácias fosse de  $1 \times 10^6$ . Essas hemácias foram bloqueadas com 96  $\mu\text{L}$  de BSA a 1% durante 30 minutos, a 37 °C. Durante esse período, diferentes concentrações dos anticorpos monoclonais a serem testados (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram incubados com a proteína recombinante PvDBP Sal I (na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), durante 20 minutos sob agitação. As placas com hemácias foram centrifugadas a 350 g por 1 minuto, os sobrenadantes dispensados e 60  $\mu\text{L}/\text{poço}$  da combinação de anticorpo monoclonal e variante PvDBP Sal I que estavam incubados foram adicionados à placa e mantidos a 37 °C por 30 minutos. Após centrifugação e descarte dos sobrenadantes, foram adicionados às hemácias 30  $\mu\text{L}/\text{poço}$  do anticorpo policlonal de coelho anti-PvDBP diluído a 1:50 em PBS com 0,2% de BSA e durante 15 minutos as placas foram condicionadas a 37 °C. Após centrifugação e lavagens, 40  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de anticorpo de cabra anti-coelho conjugado a PE diluído a 1:32 em PBS com 0,2% de BSA foram inseridos aos poços e mantidos por 15 minutos a 37 °C. As hemácias foram ressuspensas com 200  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de PBS e levadas para leitura em citômetro FACS LSRII (BD Biosciences).

As diferentes concentrações dos anticorpos monoclonais foram testadas em duplicatas. Como controle foram utilizadas hemácias sem a presença de nenhum anticorpo, apenas PBS (controle 1), hemácias sem adição de PvDBP Sal I e com a presença do anticorpo policlonal de coelho anti-PvDBP e do anticorpo de cabra anti-coelho conjugado a PE (controle 2); e um terceiro controle, hemácias com PvDBP Sal I e os demais anticorpos sem adição dos anticorpos monoclonais-teste (controle 3).

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição, conforme a fórmula:  $1 - ((\text{média da duplicata} - \text{background}) / (\text{média do controle 3} - \text{background})) \times 100$ .

### *3.9.2 ELISA de competição por sítio de ligação*

ELISA de competição por sítio de ligação em PvDBPII foram realizados entre os anticorpos monoclonais anti-PvDBP Sal I expressos e plasmas de indivíduos com anticorpos inibitórios naturalmente adquiridos contra PvDBPII, identificados através do Ensaio de inibição de ligação baseado em microplaca, descrito em 3.6. Para tanto, foram testadas 170 amostras de plasmas oriundas de 82 indivíduos com anticorpos que apresentam atividade inibitória a partir de aproximadamente 80%.

O ensaio iniciou-se com adição de 50 µL/poço do anticorpo monoclonal a ser testado na concentração de 0,5 µg/mL, em placas Corning Costar (Sigma) e deixadas em repouso durante a noite, sob refrigeração (4 °C). No dia seguinte, os poços das placas foram bloqueados com 200 µL de BSA a 3% diluído em PBST, por 2 horas, a temperatura ambiente. Durante o período de bloqueio, os plasmas dos indivíduos a serem testados foram diluídos nas concentrações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 com 1% de BSA, pré-incubados com 0,04 µg/mL da recombinante PvDBP Sal I biotinizada (ambos diluídos em PBST) e mantidos durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, 50 µL/poço da mistura de plasma e PvDBP Sal I foram colocados na placa-teste (sensibilizada com o anticorpo monoclonal), por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados 6 vezes com PBST e 50 µL de estreptavidina conjugada a HRP (Thermo Fisher Scientific) diluída a 1:9000 foram adicionados a cada poço e deixados em repouso, por 1h a temperatura ambiente. A revelação se deu através de 100 µL/poço de TMB (Thermo Fisher Scientific) e a reação foi parada com adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico diluído a 10%.

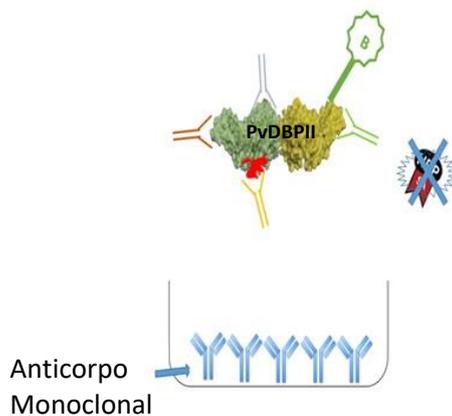
As amostras foram testadas em duplicatas. Os controles positivos utilizados foram um *pool* de plasmas de 5 indivíduos com alta atividade de inibição de ligação e o próprio anticorpo monoclonal testado no ensaio, na concentração de 8 µg/mL. Como controles negativos foram utilizados um anticorpo monoclonal anti-toxóide tetânico (denominado 43/38), produzido utilizando-se um protocolo análogo, e outro controle utilizando apenas PBS no lugar do plasma.

Os resultados foram obtidos através da concentração de PvDBP em cada poço-teste. Para tanto, foi realizada em cada placa uma curva-padrão com a diferentes concentrações da proteína, iniciando-se com 0,04 µg/mL, seguidos de 0,02 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,005 µg/mL de PvDBP Sal I. Os resultados foram expressos em porcentagem de competição, através da fórmula: 
$$= (1 - (\text{concentração da variante PvDBP Sal I no poço-teste}) / \text{concentração de PvDBP Sal I no primeiro ponto da curva [0,04]}) * 100.$$
 As leituras foram obtidas em leitor de ELISA a 450 nm.

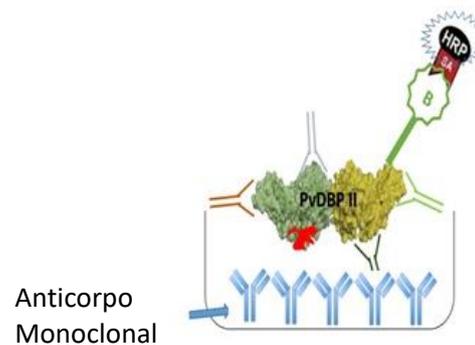
A ilustração do ensaio está representada na Figura 16 abaixo:

**Figura 16** – Representação do ensaio de competição por sítio de ligação. Na Figura A, a competição é confirmada através da ausência de cor no poço-teste, após revelação com TMB. Isso é determinado porque a variante de PvDBP utilizada é biotinizada e tem afinidade por Streptavidina (conjugada HRP) utilizada no ensaio. Se o anticorpo naturalmente adquirido anti- PvDBP encontrado plasma testado tem como alvo o mesmo sítio que o anticorpo monoclonal expresso, o primeiro se ligará com mais afinidade a proteína durante o período de pré-incubação entre o plasma e a variante de PvDBP. Caso essa afinidade seja fraca ou inexistente, tanto o anticorpo naturalmente adquirido como o anticorpo monoclonal aderido na placa se ligarão ao seu próprio sítio de reconhecimento e não haverá competição, confirmado pela presença de cor no poço-teste após revelação (Figura B).

### A. Competição



### B. Não competição



Para comparar as competições por sítio de ligação desses anticorpos inibitórios em *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* entre o anticorpo monoclonal anti-PvDBP II brasileiro e dois anticorpos monoclonais também anti-PvDBP II e expressos da mesma maneira, porém provenientes de indivíduos do Camboja foram utilizados os valores da absorbância das amostras e não os de concentração de PvDBP em cada poço-teste, através da fórmula: 
$$= (1 - (\text{média da absorbância poço teste} - \text{background}) / \text{média da absorbância do controle} - \text{background})) \times 100$$
. Os resultados foram obtidos em porcentagens de competição.

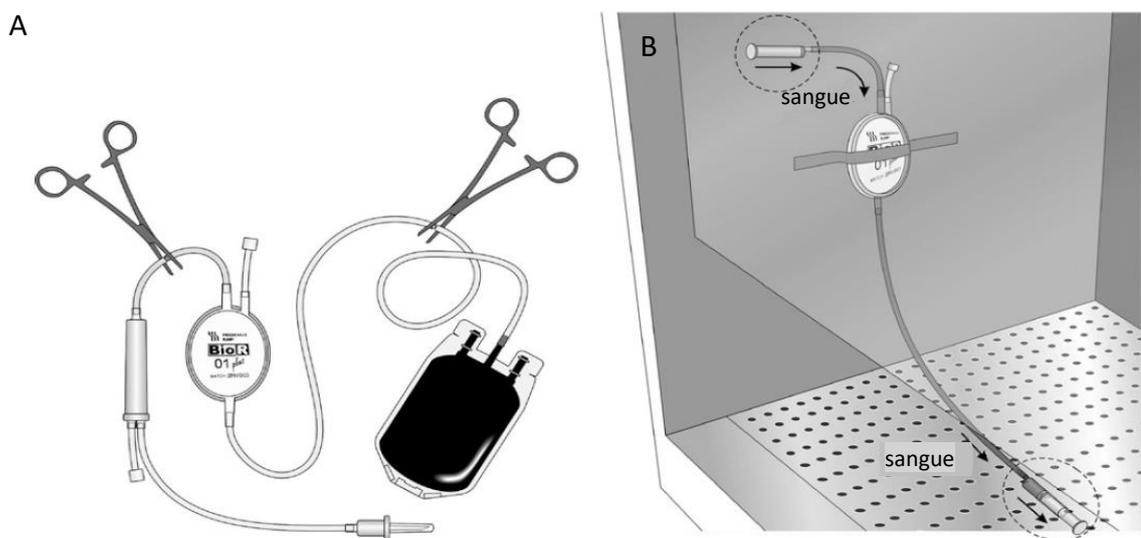
### 3.9.3 Ensaio de inibição de invasão *ex-vivo*

Para testar se os anticorpos monoclonais expressos tem capacidade de inibir a invasão do parasita em reticulócitos, ensaios *ex-vivo* com parasitas criopreservados em glicerol foram realizados nas seguintes etapas:

#### 3.9.3.1 Enriquecimento de reticulócitos

Para todos os experimentos foram coletados cerca de 80 mL de sangue venoso de um único doador O +. Após a coleta em tubos com ACD (BD Bioscience), o volume de sangue foi transferido para o sistema de depleção de leucócitos BioR 01 Max (Fresenius Kabi, Oberursel, Alemanha), demonstrado na Figura 17.

**Figura 17** – Processo de filtragem para remoção de leucócitos a partir de pequeno volume de sangue. A Figura A mostra como adaptar o filtro comercial para depleção de células brancas. Note que a bolsa de armazenamento e o adaptador devem ser removidos. A Figura B exibe o filtro adaptado sendo utilizado em fluxo laminar. O sangue deve ser inserido com uma seringa de 20 mL no conector antes do filtro e após a passagem, coletado na outra extremidade também com uma seringa de 20 mL. Após a filtragem, o sistema foi lavado com meio McCoy 5A incompleto, com propósito de remover o máximo de hemácias que poderiam estar retidas no filtro.



O sangue depletado de leucócitos foi centrifugado a 1000 g, durante 25 minutos, a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma foi removido até atingir 80–85% de hematócrito e armazenado a 4 °C. O sangue foi acondicionado em estufa a 37 °C, durante 1 hora e centrifugado novamente a 3200 g, durante 45 minutos, a 32 °C. Após a centrifugação, o plasma foi removido restando apenas 6 mm acima da concentração de hemácias. Cerca de 25% da região superior das hemácias foi removida, misturada ao plasma armazenado a 4 °C em uma proporção de 1:1, novamente incubadas por 1h em estufa a 37 °C e centrifugadas a 3200 g, durante 45 minutos, a 32 °C. Em seguida, o plasma foi removido até restar 6 mm acima do concentrado de hemácias e foram coletados 10% da região superior, onde se encontram os reticulócitos. Após duas lavagens com meio McCoy 5A incompleto (Thermo Fisher Scientific) a contagem de reticulócitos se deu através de esfregaço com Novo azul de metileno (Sigma) e quantificado usando a fórmula: (número de reticulócitos / número de hemácias) × 100.

Os reticulócitos foram armazenados em meio McCoy 5A incompleto (Thermo Fisher Scientific) na proporção de 1:1, a 4 °C, durante no máximo uma semana.

Esse protocolo de enriquecimento de reticulócitos foi adaptado de Golenda, Li e Rosenberg (1997) e Shaw-Saliba (2016).

### 3.9.3.2 Ensaio de invasão *ex-vivo*

#### 3.9.3.2.1 Descongelamento de parasitos

As amostras de sangue com hemácias parasitadas por *P. vivax*, armazenadas em criotubos, foram previamente leucodepletadas com BioR 01 Plus or Max (Fresenius Kabi), conforme demonstrado na Figura 17, antes do congelamento. O processo de descongelamento se inicia mantendo esses criotubos a temperatura ambiente após retirados do nitrogênio, por 1 minuto, seguido de 1 minuto a 37 °C em banho-maria. Para os ensaios de invasão foram utilizados cerca de 10 mL de hemácias parasitadas do mesmo doador.

O sangue parasitado foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e uma solução de NaCl a 12% foi adicionada gota a gota, misturando suavemente. Para essa etapa, a quantidade de NaCl 12% utilizado foi 1/5 volume da amostra no tubo. Em seguida, foi

adicionado volume de NaCl a 1,6% correspondendo a 10 x o volume da amostra inicial, sendo a mistura homogeneizada e centrifugada a 180 g durante 8 minutos.

O sobrenadante foi aspirado, o precipitado ressuspendido suavemente e as hemácias contendo os parasitas lavadas duas vezes com meio McCoy 5A incompleto (Thermo Fisher Scientific). Lâminas de esfregaço e gota espessa foram preparadas e coradas com Panótico Rápido LB (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) para observar a quantidade e viabilidade desses parasitas.

#### 3.9.3.2.2 Maturação dos parasitos e Ensaios de invasão

Para os ensaios de invasão foram utilizadas 6  $\mu\text{L}$ /poço de hemácias parasitadas após o descongelamento em um volume total de 100  $\mu\text{L}$ /poço de meio HyClone™ IMDM com HEPES, sem L-Glutamina (GE Healthcare) enriquecido com 10% de soro AB+ inativado e 1/100 do suplemento Gibco® GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific) (IMDM suplementado).

Os anticorpos monoclonais testados foram adicionados no início da maturação dos parasitas, em poços separados (cada anticorpo em um poço diferente), em duplicatas e foram diluídos com o meio IMDM suplementado. O primeiro ensaio de inibição de invasão foi realizado utilizando o anticorpo monoclonal brasileiro (134/135) com as concentrações de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para o segundo ensaio, a concentração escolhida para esse mAb foi de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como comparação, foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-PvDBP11 de um indivíduo residente no Camboja (denominado 99/100), na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O controle foi um anticorpo monoclonal anti-toxóide tetânico (denominado 43/38) na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Todos os anticorpos monoclonais utilizados nesse ensaio foram expressos com a mesma metodologia e no Laboratório do Christopher King na Case Western Reserve University, em Cleveland, Ohio, Estados Unidos. Citocalasina D na concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , também foi utilizada como um dos controles do ensaio. Esse composto é um metabólito fúngico que inibe a polimerização da actina, impedindo a invasão de merozoítos em hemácias presentes na cultura. Poços sem adição de nenhum anticorpo monoclonal revelaram a parasitemia do experimento.

Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços e após a adição dos parasitas ao meio IMDM suplementado na presença dos anticorpos-teste, as placas foram inseridas em um sistema fechado com uma mistura dos gases com 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> e mantidas em estufa

a 37 °C. Após 24 horas de cultura, esfregaços foram preparados com o propósito de avaliar o desenvolvimento/maturação dos parasitas. A cultura foi novamente verificada cerca de 38 – 40 horas depois do seu início, para que fossem estabelecidas a relação esquizonte/trofozoíto maduro. Quando o total de esquizontes somaram 60–70%, com 40–30% de trofozoítos maduros, 6 µL/poço de reticulócitos previamente enriquecidos foram adicionados. Nesse momento, a cultura passou do hematócrito inicial 6% para 12%.

As placas foram recolocadas nos recipientes fechados na presença da mistura de gases, na estufa a 37 °C, para que os esquizontes fossem rompidos e os merozoítos invadissem os reticulócitos adicionados. Após 24 horas da adição dos reticulócitos, dois esfregaços de cada poço-teste (totalizando 4 esfregaços de cada anticorpo monoclonal testado) foram fixados por 30 segundos em metanol e corados com Giemsa durante 30 minutos.

As parasitemias foram calculadas de acordo com o número de parasitos em estágios iniciais de desenvolvimento encontrados em 20.000 hemácias contadas manualmente, sob aumento de 1000x em microscópio óptico.

### 3.10 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas no software de estatística R (versão 3.3.0). Proporções foram comparadas usando teste padrão  $\chi^2$  ou Mantel-Haenszel  $\chi^2$  para tendências lineares, enquanto que variáveis contínuas foram comparadas usando teste não-paramétrico (prova U de Mann-Whitney). Correlações foram avaliadas usando o teste de correlação não-paramétrico de Spearman. A significância estatística foi definida a nível de 5%. Intervalos de confiança de 95% e intervalos interquartis (IQR) foram estimados quando apropriado.

A abordagem descrita por Sarkar et al. (2012) foi utilizada para avaliar se as respostas de anticorpos sofreram *boosting* depois de episódios de malária vivax. Foram analisadas amostras consecutivas de plasma (entre 2 e 7 amostras do mesmo paciente) coletados de 131 indivíduos que tiveram um ou mais episódios diagnosticados microscopicamente durante o seguimento. As amostras foram coletadas em diferentes momentos em relação ao evento de interesse (o episódio de malária vivax). Foram comparadas as medianas dos níveis de anticorpos para cada antígeno (e seu respectivo IQR) em amostras coletadas antes do episódio de malária com aquelas medidas em diferentes pontos após o episódio de malária.

Análises de sobrevida foram utilizadas para comparar o tempo do primeiro episódio clínico de malária em indivíduos com níveis variados de anticorpos específicos. O desfecho foi malária clínica causada por *P. vivax*, confirmada laboratorialmente, independente da densidade parasitária; os pacientes apresentavam, febre, dor de cabeça ou qualquer outro sintoma/sinal relacionado a malária no momento do estudo ou 48 horas antes. A cada inquérito, os participantes do estudo que não foram diagnosticados com malária (negativo para PCR Real Time e microscopia) tiveram seus níveis de anticorpos mensurados. Então, esses indivíduos foram seguidos até o próximo inquérito, onde seu nível de anticorpos foi novamente avaliado. A unidade de análise foi o tempo (em dias) entre o primeiro (*baseline*) e o próximo inquérito em que o indivíduo participou, entre a primeira avaliação de anticorpo e a data em que o indivíduo deixou o estudo ou entre a medida realizada no *baseline* e o próximo episódio de malária vivax, qual viesse primeiro. Cada participante do estudo contribuiu com até sete períodos de observação.

Modelos de hazards proporcionais de Cox com efeitos mistos foram utilizados para comparar taxas de risco para o tempo do primeiro episódio infecção clínica de malária causada por *P. vivax* entre tercís de níveis de anticorpos ajustado com a idade do indivíduo (estratificado como <15 anos e  $\geq 15$  anos), gênero e genótipo DARC. O agrupamento de observações individuais repetidas em diferentes pontos no tempo foi modelado como um efeito aleatório (Vaida e Xu, 2000). Indivíduos DARC-negativos foram excluídos da análise de sobrevivência, uma vez que possuem risco negligenciável de malária causada por *P. vivax*. Todos os indivíduos DARC- positivos (não importando o seu genótipo) foram incluídos.

Uma abordagem similar foi utilizada para analisar as taxas de risco para o tempo do primeiro episódio de malária vivax de acordo com os níveis de anticorpos bloqueadores anti-PvDBP. Para esse propósito, os indivíduos participantes foram classificados dentro de tercís para a porcentagem de atividade de inibitória contra variante Sal I de PvDBP.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra PvDBP e outros antígenos

Participaram do estudo de campo 466 indivíduos que contribuíram com 1126 amostras de plasma. Desses, 263 (56,4%) são homens e 203 (43,6%) mulheres, com média de idade de 26 anos. Do total de indivíduos testados; 4,8% (25) possuem amostras para todos os cortes e 57,3% (267) em dois ou mais inquéritos transversais.

Entre 62,4% e 85,6% das 1126 amostras possuíam anticorpos contra as variantes de PvDBP (Tabela 5). As respostas também foram altas para PvMSP-1<sub>19</sub> (67,5%), porém mais baixas para as proteínas PvMSP-3 $\alpha$ , PvMSP-9. Somente 32,6% das amostras possuíam anticorpos para o antígeno de *P. falciparum* PfEBA-175, um membro da família de proteínas ligadoras de eritrócitos conhecidas como *Duffy binding-like*.

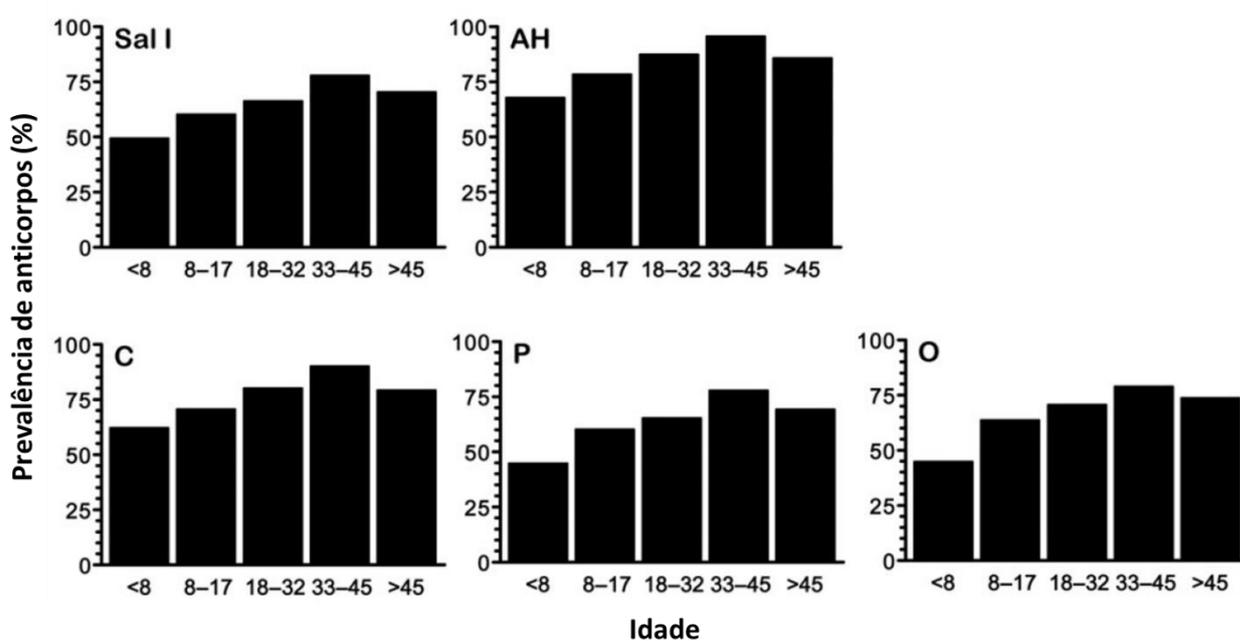
**Tabela 5** – Proporção (%) de amostras dos indivíduos do assentamento agrícola no estado do Amazonas (n= 1126), Remansinho, com anticorpos IgG para cinco variantes de *Plasmodium vivax Duffy binding protein* (PvDBP), três proteínas de superfície de merozoíto de *P. vivax* e um antígeno estágio sanguíneo de *P. falciparum*, entre os anos de 2010-2013.

Antígeno	Variante	Proporção (%)	(95% de intervalo de confiança)
PvDBP	Sal I	64,4	(61,6 – 67,2)
	AH	85,6	(83,5 – 87,6)
	C	77,7	(75,3 – 80,1)
	O	68,7	(66,0 – 71,4)
	P	62,4	(59,6 – 65,2)
PvMSP-1 <sub>19</sub>	Belém	67,5	(64,8 – 70,2)
PvMSP-3 $\alpha$ BII	Belém	50,8	(47,9 – 53,7)
PvMSP-9 Nt	Belém	38,2	(35,4 – 41,0)
PfEBA-175		32,6	(29,9 – 35,4)

Para avaliar se existe variação no número de respondedores para as cinco variantes de PvDBPII testadas, de acordo com o aumento da idade do indivíduo, foram selecionadas as primeiras amostras de 451 participantes (com idade conhecida) e divididas em quintis, de forma que em cada grupo estivessem de 87 a 91 indivíduos. A Figura 18 mostra que a proporção de respondedores aumentou linearmente com a idade dos doadores de plasma.

Para complementar, o teste de Mantel-Haenszel  $\chi^2$  para tendência linear mostrou aumento significativo na prevalência de anticorpos com aumento da idade para todas as variantes de PvDBPII ( $P < 0,001$ ).

**Figura 18** – Prevalência de anticorpos IgG para cinco variantes de *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* (PvDBP) nos indivíduos do estudo de acordo com a idade.



Esses níveis de anticorpos anti-PvDBPII correlacionaram-se positivamente com a idade, ou seja, existe uma tendência do indivíduo possuir altos níveis de anticorpos contra as cinco variantes de PvDBPII testadas conforme o aumento da idade, compatível com um efeito de *boosting* devido a repetidas exposições à *P. vivax*. Níveis de anticorpos IgG para PvMSP-1<sub>19</sub>, PvMSP-9 e PfEBA-175 também correlacionaram-se positivamente com a idade (Tabela 6).

**Tabela 6** – Coeficiente de correlação de Spearman entre idade e níveis de anticorpos IgG para todas as variantes de PvDBP, proteínas de superfície de merozoíto (MSP) e PfEBA-175, em 451 indivíduos do estudo com idade conhecida.

Antígeno	Variante	Coeficiente de correlação ( $\rho$ )	Valor de <i>P</i>
PvDBP	Sal I	0,241	<0,0001
	AH	0,291	<0,0001
	C	0,284	<0,0001
	O	0,300	<0,0001
	P	0,285	<0,0001
PvMSP-1 <sub>19</sub>	Belém	0,162	0,001
PvMSP-3 $\alpha$ BII	Belém	0,088	0,061
PvMSP-9 Nt	Belém	0,109	0,021
PfEBA-175		0,110	0,020

#### 4.2 Diversidade de sequência e reconhecimento de anticorpos para variantes de PvDBP

Nenhum dos oito haplótipos encontrados no local foram idênticos as proteínas expressas como antígenos recombinantes neste estudo (Tabela 7). A variante mais prevalente na área (BR1, encontrada em um terço dos isolados analisados) compartilha quase todos, exceto três resíduos (posições 308, 386 e 503), com o antígeno PvDBP AH. Uma pequena divergência de aminoácidos foi encontrada em BR7 e PvDBP AH (1 resíduo), BR4 e PvDBP P (4 resíduos); e BR2 e PvDBP O (4 resíduos). As maiores discordâncias foram encontradas entre PvDBP P e BR1; e PvDBP P e BR2 (8 resíduos cada). Interessantemente, a maioria dos indivíduos do estudo reconhecem variantes de PvDBP com as quais provavelmente nunca foram expostos.

**Tabela 7** – Resíduos de aminoácidos polimórficos presentes no domínio II de PvDBP de 46 isolados provenientes do assentamento rural, no estado do Amazonas, Brasil (nos anos de 2010-2011), comparados com PvDBP Sal I e quatro variantes de PvDBP de Papua Nova Guiné (AH, C, P e O) que foram expressas como proteínas recombinantes nesse estudo.

Variante de PvDBP	Resíduo de aminoácido (posição de acordo com PvDBP Sal I)													Proporção no Remansinho (%)
	308	333	371	375	384	385	386	390	417	424	437	447	503	
PvDBP Sal I	R	L	K	N	D	E	K	R	N	L	W	S	I	0
PvDBP AH	S	.	E	.	G	.	Q	.	K	I	R	.	K	0
PvDBP C	S	.	.	.	G	.	Q	.	K	I	R	.	K	0
PvDBP P	S	F	.	D	G	K	N	H	K	I	R	.	K	0
PvDBP O	S	.	.	.	G	.	.	H	.	I	.	K	.	0
BR1	.	.	E	.	G	.	.	.	K	I	R	.	.	34,8
BR2	.	.	.	.	G	.	.	H	.	.	.	.	K	23,9
BR3	.	.	.	.	G	K	N	H	.	.	R	.	K	15,2
BR4	S	.	E	.	G	K	N	.	K	I	R	.	K	10,9
BR5	S	.	.	.	G	K	N	H	.	I	.	.	K	8,7
BR6	.	.	.	.	G	.	.	.	K	I	R	.	.	2,2
BR7	S	.	E	.	G	.	.	.	K	I	R	.	K	2,2
BR8	.	.	.	.	G	K	.	H	.	.	R	.	.	2,2

**Nota:** os pontos indicam aminoácido igual a cepa de referência (PvDBP Sal I) na posição em questão.

Os níveis de anticorpos IgG para as diferentes proteínas recombinantes de PvDBP II no momento da adesão do indivíduo no estudo foram altamente correlacionados entre si, conforme mostra Tabela 8. Tal fato sugere que a diversidade na sequência do domínio II de PvDBP tem pequeno impacto na resposta quantitativa de anticorpos IgG.

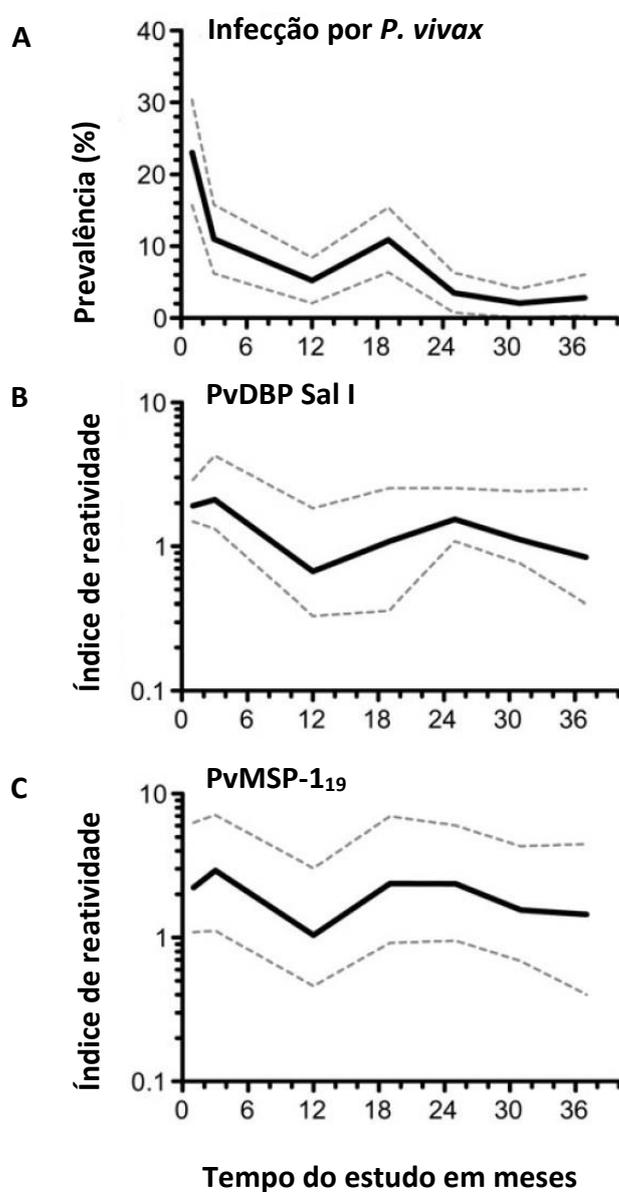
**Tabela 8** - Coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) (acima da diagonal) e seu valor de  $P$  correspondente (abaixo da diagonal) dos níveis de anticorpos pareados entre as cinco variantes de PvDBP nos 466 indivíduos do estudo.

PvDBP	Sal I	AH	C	O	P
Sal I		0,832	0,863	0,851	0,901
AH	< 0,0001		0,962	0,966	0,952
C	< 0,0001	< 0,0001		0,958	0,970
O	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001		0,954
P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	

### 4.3 Prevalência de malária e níveis de anticorpos ao longo do tempo

A prevalência de infecção confirmada em laboratório (por microscopia e/ou qPCR) variou acentuadamente no assentamento rural durante os meses de março-maio/2010, maio-julho/2010, março-abril/2011, outubro-novembro/2011, abril-maio/2012, outubro-novembro/2012 e abril-maio/2013, compreendendo o total de 37 meses. O gráfico de prevalência de *P. vivax* durante esses meses revela um surto devido a uma expansão clonal do parasita em outubro/2011 (Figura 19 A) (BATISTA et al., 2014). Como consequência, os níveis de anticorpos IgG anti- PvDBP Sal I (Figura 19B) aumentaram cerca de seis meses depois do surto (mês 24), decaindo até o fim das coletas. Já os anticorpos anti - PvMSP-1<sub>19</sub> (Figura 19C) tiveram seus níveis aumentados logo após o surto, mantendo-se constante por 6 meses depois (mês 24) e com leve queda até o final do estudo. Observando os três gráficos da Figura 19, podemos afirmar que os níveis de anticorpos dessas proteínas espelharam as mudanças na prevalência de *P. vivax* durante o tempo de realização do estudo.

**Figura 19** – Variação temporal na prevalência de *Plasmodium vivax* e níveis de anticorpos IgG para *Duffy binding protein* (PvDBP Sal I) e a região C-terminal de 19kDa da proteína 1 de superfície de merozoíto (PvMSP-1<sub>19</sub>) nos indivíduos do assentamento rural Remansinho, no Estado do Amazonas. Em A, a prevalência de *P. vivax* detectada por microscopia e/ou diagnóstico quantitativo com reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) durante os 37 meses de estudo (linha sólida); as linhas pontilhadas representam intervalo de confiança de 95%. Em B e C, encontram-se as medianas de índice de reatividade de anticorpos IgG para PvDBP Sal I (B) e PvMSP-1<sub>19</sub> (C), detectados através do ensaio multiplex durante os inquéritos transversais (linha sólida); as linhas pontilhadas representam os intervalos interquartis.

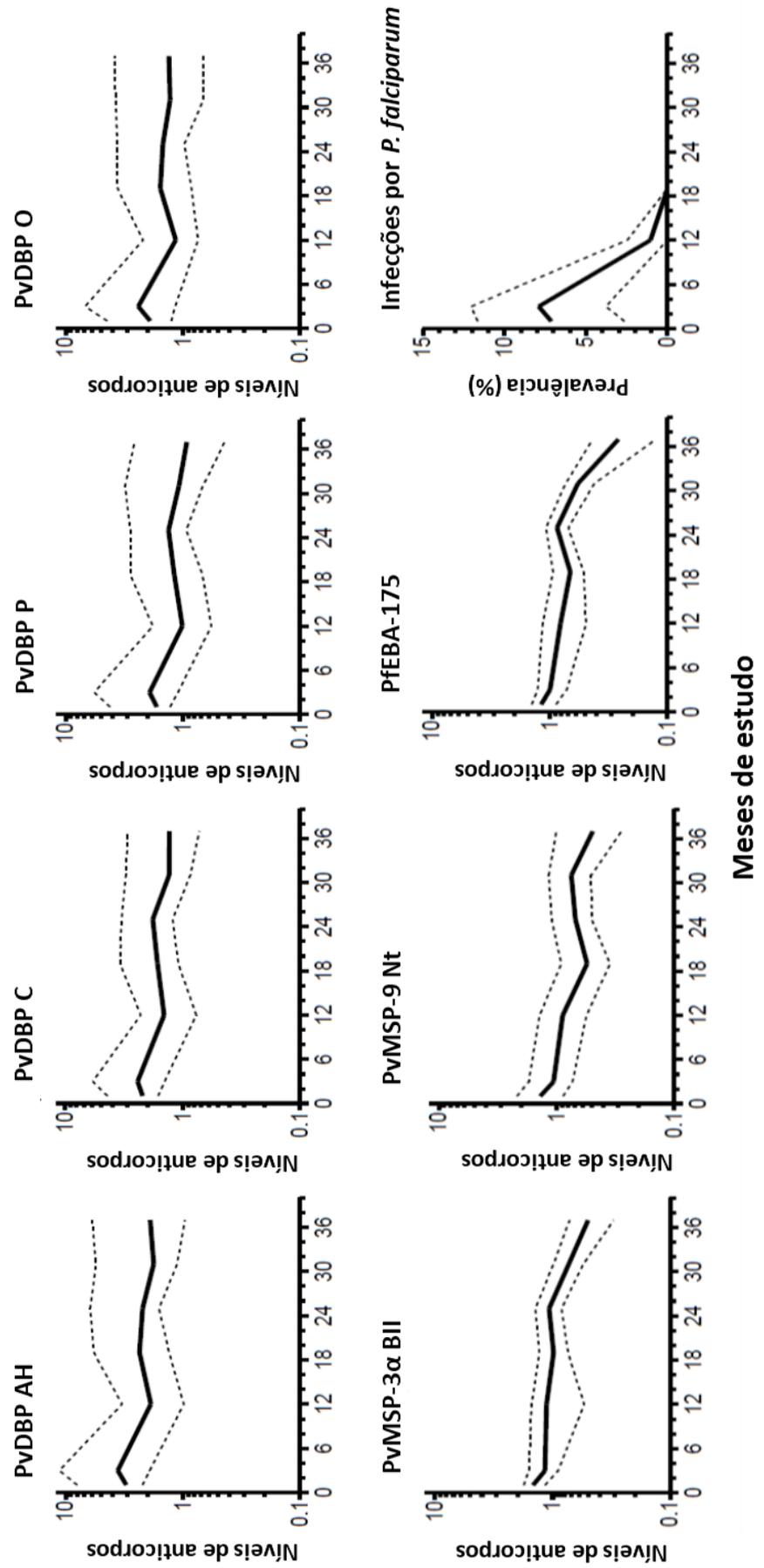


Para as outras variantes de PvDBP também foi possível observar um discreto aumento no nível de anticorpos se iniciando por volta do mês 18 e se mantendo levemente alto até o mês 24 (Figura 20), que corresponde a durante e seis meses depois do aumento do número de casos de malária causada por *P. vivax* (outubro/2011).

Medianas dos níveis de anticorpos para PvMSP-3 $\alpha$  BII, PvMSP-9 Nt e PfEBA-175 diminuíram de acordo com o tempo, com um pequeno ou nenhum aumento nos níveis de anticorpos após o surto relatado (Figura 20).

Poucas infecções por *P. falciparum* foram diagnosticadas durante o primeiro ano de estudo e nenhum caso foi diagnosticado depois de março–abril de 2011, conforme é possível observar no canto inferior direito da Figura 20.

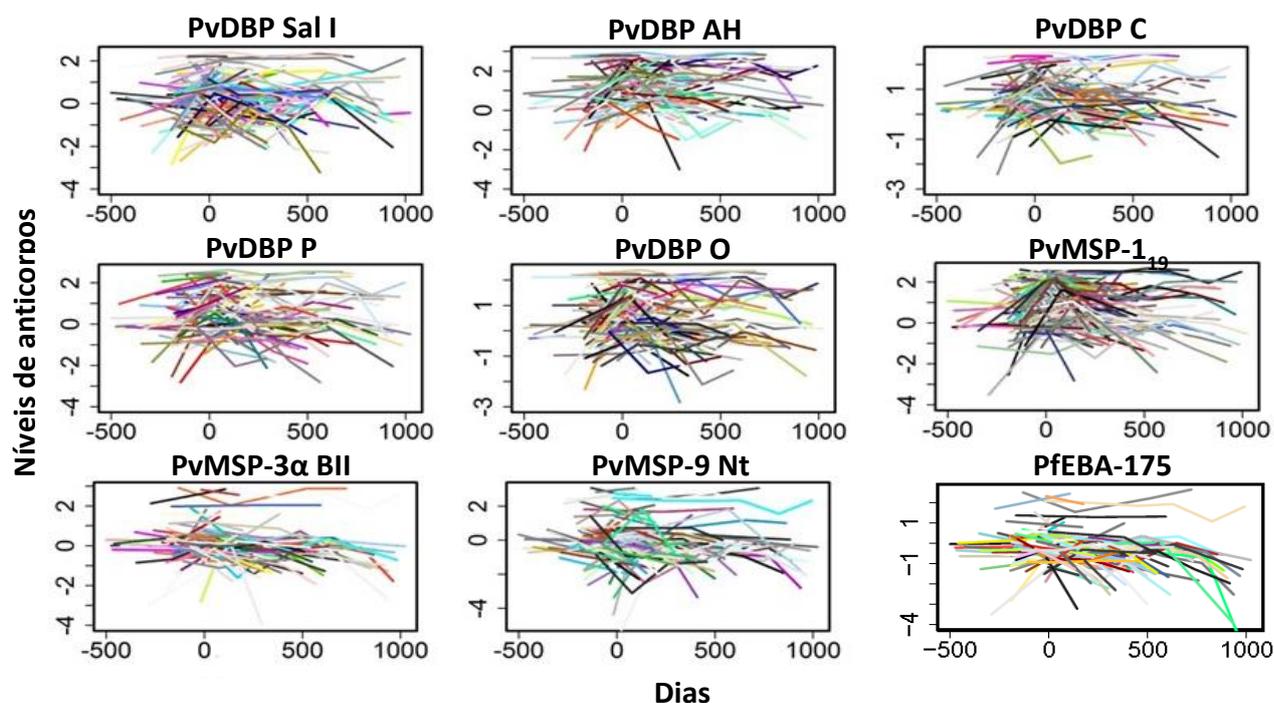
**Figura 20** – Níveis de anticorpos IgG para vários antígenos de malária em relação ao tempo do estudo, nos indivíduos do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil, durante os anos de 2010-2013. Nos gráficos das proteínas das proteínas as linhas contínuas indicam a mediana dos índices de reatividade dos anticorpos para PvDBP AH, PvDBP P, PvDBP C, PvDBP O, PvMSP-3 $\alpha$ , PvMSP-9 e PFEBA-175, detectados pelo ensaio multiplex baseado em microesferas durante os sete inquéritos transversais. As linhas pontilhadas representam os intervalos interquartis. O gráfico da prevalência de *Plasmodium falciparum*, encontrado no canto inferior direito, mostra a parasitemia detectada por microscopia e/ou qPCR durante o mesmo período de tempo, os intervalos de confiança de 95% são representados pelas linhas pontilhadas.



Para avaliar a capacidade de *boosting* (aumento acentuado e em curto espaço de tempo) desses anticorpos, foram selecionados indivíduos diagnosticados com malária vivax por microscopia no período entre os cortes transversais. Para tanto, foram escolhidos participantes que possuíam ao menos duas amostras de plasma avaliadas para a presença de anticorpos IgG durante os inquéritos, uma anterior ao episódio de malária registrado pelo microscopista local e outra após o episódio de malária causada por *P. vivax*. Cento e trinta e um indivíduos obedeceram a esse critério e tiveram suas amostras analisadas. A primeira amostra de plasma de cada indivíduo foi coletada em média, 132 dias antes do episódio de malária diagnosticada. Amostras de plasma pós-infecção (1 ou 6 por indivíduo) foram distribuídas em 8 grupos (formados com 32 amostras ou mais em cada grupo) de acordo com o tempo decorrido desde o mais recente episódio de malária.

Trajetórias individuais foram traçadas de acordo com a resposta de cada indivíduo em relação ao tempo (dias) para cada proteína (Figura 21). O dia 0 marca o dia em que o indivíduo foi diagnosticado com malária. Nenhum padrão de resposta antes ou após o dia da infecção pode ser observado entre as variantes de PvDBPII e as demais proteínas avaliadas, conforme mostra a Figura 21.

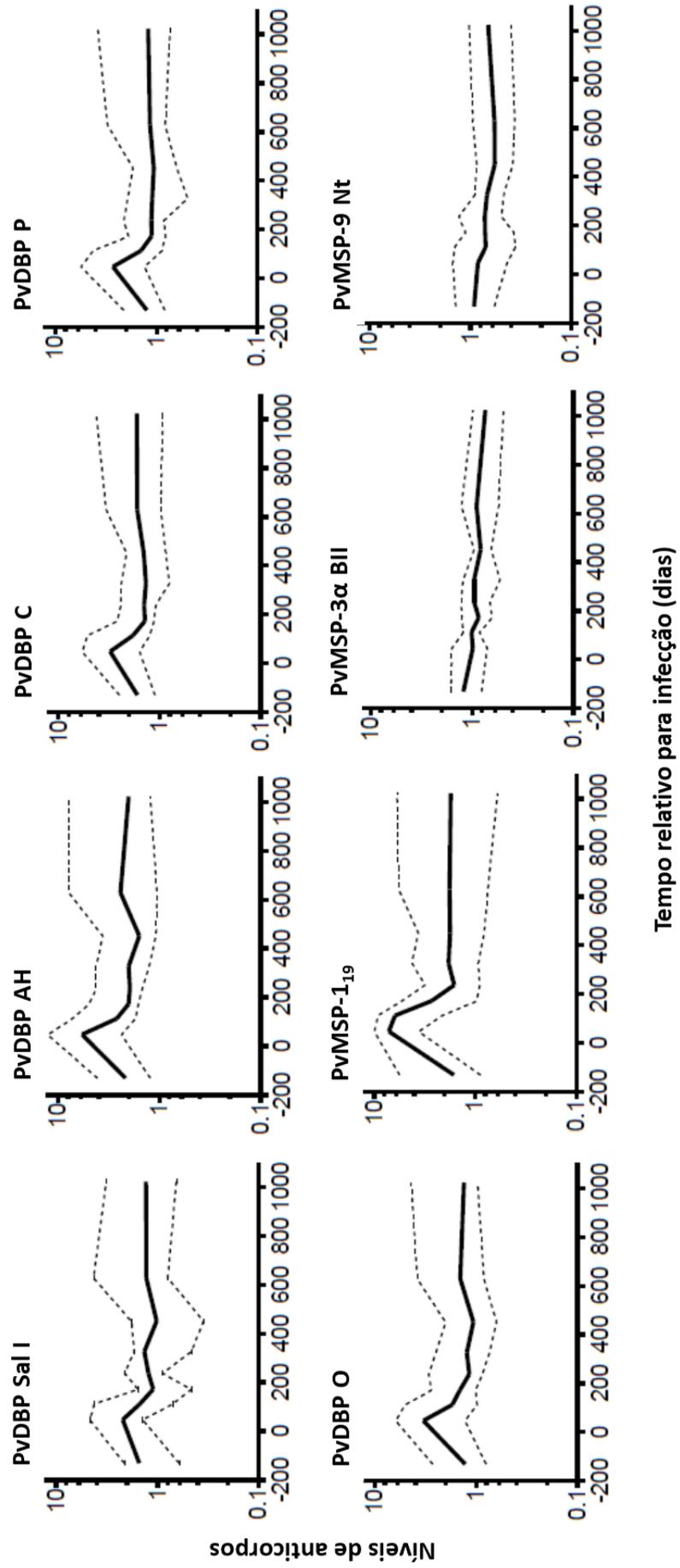
**Figura 21** - Variação nos níveis de anticorpos IgG naturalmente adquiridos para antígenos de estágio assexual sanguíneo de *Plasmodium vivax* e para um antígeno de *Plasmodium falciparum* (PfEBA-175) em função da ocorrência de um episódio de malária vivax na população do estudo entre os anos de 2010-2013. Os níveis de anticorpos são expressos como logaritmo natural do índice de reatividade.



Esses mesmos dados foram organizados em medianas e seus respectivos intervalos interquartis demonstrados na Figura 22. Nota-se que as variantes de PvDBP apresentam *boosting* após o dia 0 (dia de detecção da doença), com posterior queda e então os níveis de anticorpos se mantiveram constantes. Vale ressaltar que não foi detectado nesses indivíduos selecionados, episódio de malária posterior ao descrito no dia 0. O aumento acentuado é também claramente perceptível para PvMSP-1<sub>19</sub>.

Para os demais antígenos (PvMSP-3 $\alpha$  BII, PvMSP-9 Nt e PfEBA-175) não foi possível observar um aumento do nível de anticorpos IgG após o diagnóstico de malária vivax.

**Figura 22** – *Boosting* de anticorpos IgG naturalmente adquiridos após episódio de malária causada por *Plasmodium vivax* na população do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil. Os níveis de anticorpos estão expressos em índices de reatividade. As linhas contínuas mostram os valores das medianas e as pontilhadas representam os intervalos interquartis.

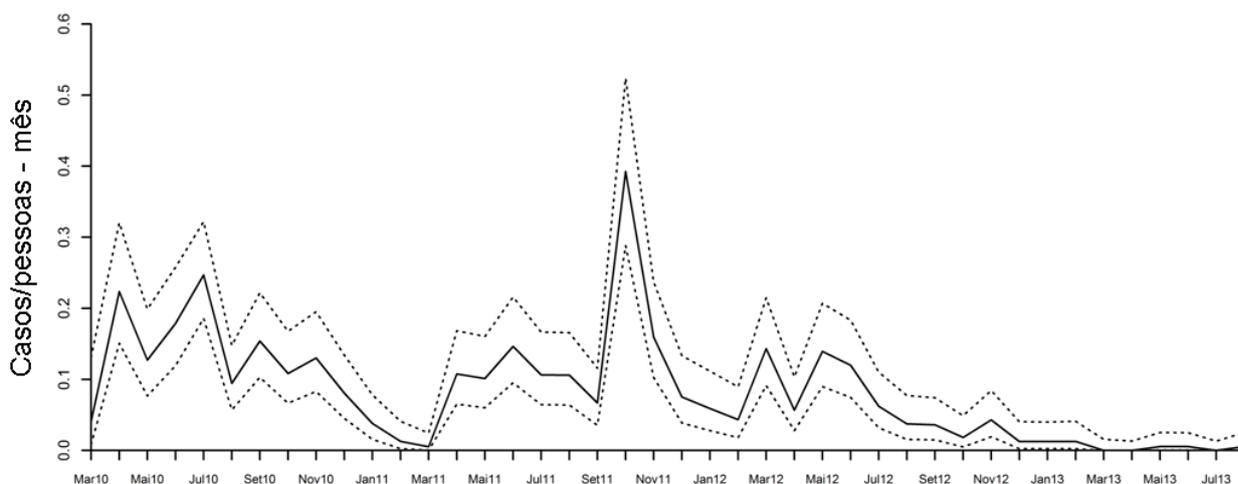


#### 4.4 Incidência de infecções por *Plasmodium vivax* na área de estudo

Uma média de 8,4 de episódios de malária vivax por 100 pessoas-mês sob risco foram registrados nessa população durante os inquéritos transversais, com pico de 39,3 casos por 100 pessoas-mês em outubro de 2011. Durante todo o período do estudo, foram registrados 529 casos de malária diagnosticados por microscopia convencional.

As variações na incidência de malária durante todo o período estudado, com um pequeno surto em outubro de 2011 e um declínio na transmissão de *P.vivax* após o surto, pode ser observado na Figura 23.

**Figura 23** – Incidência de *Plasmodium vivax* na população de estudo entre março de 2010 a agosto de 2013. As linhas contínuas representam a incidência (casos/pessoas-mês), as linhas pontilhadas mostram os intervalos de confiança de 95%.



A incidência para *P. falciparum* foi de 0,008 no mês de abril de 2010 e 0,005, no mês de julho de 2010. Após esse período, não foram registrados casos de malária causada por *P. falciparum* na área estudada.

#### 4.5 Níveis de anticorpos e parasitemia em episódio de malária vivax

Oitenta e oito amostras de plasma foram coletadas de indivíduos diagnosticados por qPCR com infecção causada por *P. vivax*. Esses indivíduos foram divididos em assintomáticos (52) e sintomáticos (36). Níveis similares de anticorpos para todos os antígenos testados foram encontrados entre os dois grupos, sugerindo que não há associação entre níveis de anticorpos e presença ou não de sintomas entre os infectados (Tabela 9).

Além disso, as densidades parasitárias entre indivíduos com níveis diferentes de anticorpos (estratificados em quartis) mostraram-se semelhantes ( $P$  variando entre 0,241 e 0,931; teste de Kruskal-Wallis). Esses dados sugerem que nas amostras analisadas, altos níveis de anticorpos específicos não foram capazes de controlar a multiplicação do parasita.

**Tabela 9** – Mediana de níveis de anticorpos para antígenos de estágio-sanguíneo da malária em amostras de plasmas coletadas de assintomáticos e sintomáticos infectados com *Plasmodium vivax*, no assentamento rural no estado do Amazonas, Brasil.

Antígeno	Mediana de reatividade de anticorpos (IQR)		$P^*$
	Assintomáticos (n = 52)	Sintomáticos (n = 36)	
PvDBP Sal I	2.12 (0.82 – 5.30)	2.16 (1.17 – 3.32)	0.629
PvDBP AH	3.94 (1.88 – 13.17)	2.96 (2.27 – 10.00)	0.752
PvDBP C	2.36 (1.35 – 7.02)	2.21 (1.68 – 4.31)	0.727
PvDBP P	2.01 (1.13 – 6.56)	1.89 (1.16 – 4.41)	0.623
PvDBP O	2.39 (1.06 – 7.06)	2.15 (1.23 – 4.85)	0.659
PvMSP-1 <sub>19</sub>	3.67 (1.21 – 8.35)	5.11 (1.89 – 9.26)	0.434
PvMSP - 3 $\alpha$	1.32 (0.85 – 1.68)	1.21 (0.93 – 1.73)	0.980
PvMSP-9	1.06 (0.58 – 1.87)	0.92 (0.52 – 3.02)	0.809
PfEBA-175	0.95 (0.67 – 1.27)	0.98 (0.68 – 1.21)	0.745

#### 4.6 Risco prospectivo de malária clínica causada por *Plasmodium vivax*

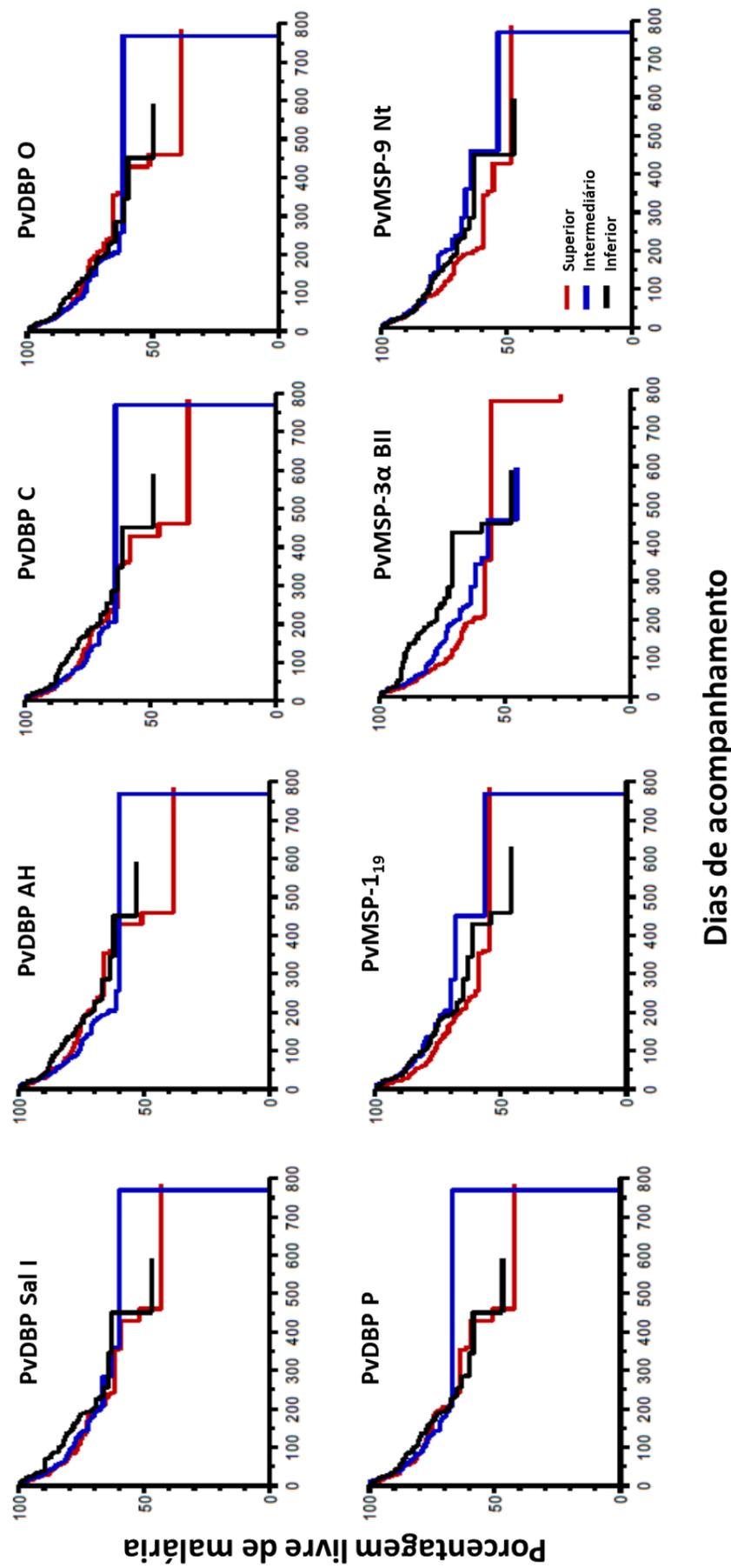
Análises de sobrevivência para determinar a relação entre níveis de anticorpos e proteção contra infecção por malária vivax foram demonstradas através de estimativa de Kaplan-Meier para as diferentes proteínas testadas (Figura 24). Para tanto, os indivíduos foram divididos em tercís de acordo com o nível de resposta de seus anticorpos: superior, para aqueles com níveis mais altos de anticorpos; intermediários, formado por indivíduos com níveis médio de anticorpos e tercil inferior, constituído daqueles com respostas mais baixas ou ausentes.

Para a construção dessa estimativa foram selecionados indivíduos obrigatoriamente DARC positivos e negativos para malária no momento da entrada na análise (n=406). A cada corte, esses indivíduos foram agrupados em tercils e acompanhados até o próximo inquérito em que possuísse um novo dado de sorologia. Se, nesse novo corte, o indivíduo analisado continuasse negativo para malária, prosseguia no estudo. Durante o período entre os cortes os participantes foram investigados quanto a diagnósticos de malária feitos pelos microscopistas locais. Dependendo do nível de resposta ao antígeno testado durante a realização do inquérito, o indivíduo poderia mudar de tercil a cada corte, ou seja, no primeiro ele poderia pertencer ao superior e no segundo, ao intermediário. A unidade de análise foi o período de observação (em dias) entre o início do estudo e a próxima análise de anticorpos, o próximo episódio de malária ou a data em que o indivíduo deixou o estudo. Cada indivíduo contribuiu com um a sete períodos de observação. Para essa estimativa, foram incluídas 924 análises de anticorpos e 220 eventos (episódios de malária) foram registrados.

As análises de sobrevida, ilustradas na Figura 24, não mostraram atraso no tempo decorrido até o próximo episódio de malária vivax clínica nos tercils superior e intermediário de respostas de anticorpos IgG para nenhuma variante de PvDBPII ou PvMSP, quando confrontados com tercil inferior.

Quando comparamos o tempo para o primeiro episódio de malária clínica entre os tercils dos níveis de anticorpos, utilizando o modelo de hazards proporcionais de Cox ajustado para idade, sexo e genótipo Duffy, não foi possível encontrar nenhuma associação significativa entre níveis de anticorpos IgG específicos e risco prospectivo de malária vivax clínica, conforme pode ser observado na Tabela 10.

**Figura 24** – Proporção de indivíduos do estudo que permaneceram livres de malária vivax clínica diagnosticada por microscópio, de acordo com os níveis de anticorpos para as variantes de *Duffy binding protein* (PvDBP) AH, Sal I, P, C e O, as proteínas de superfície de merozoíto PMSP-1<sub>19</sub>, PvMSP-3 $\alpha$  e PvMSP-9.



Dias de acompanhamento

**Tabela 10** – Associação entre níveis de anticorpos naturalmente adquiridos para variantes de PvDBPII e PvMSP e risco prospectivo de malária vivax clínica em indivíduos do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil.

Antígeno	Variante	Tercil intermediário vs tercil inferior de índices de reatividade		Tercil superior vs tercil inferior de índices de reatividade	
		Razão de hazards (95% de IC)	P	Razão de hazards (95% de IC)	P
PvDBP	Sal I	1,05 (0,73- 1,51)	0,78	1,14 (0,78– 1,67)	0,49
	AH	0,88 (0,62- 1,25)	0,47	0,88 (0,60- 1,27)	0,49
	C	0,91 (0,64- 1,29)	0,60	0,97 (0,67- 1,40)	0,89
	O	0,83 (0,59- 1,16)	0,28	0,89 (0,61- 1,26)	0,48
	P	0,81 (0,56- 1,15)	0,25	0,93 (0,64- 1,34)	0,69
PvMSP-1 <sub>19</sub>	Belém	0,82 (0,58- 1,16)	0,26	1,20 (0,85- 1,68)	0,31
PvMSP-3 $\alpha$ BII	Belém	1,11 (0,76- 1,61)	0,60	1,21 (0,83- 1,77)	0,33
PvMSP-9 Nt	Belém	0,86 (0,60- 1,24)	0,42	1,01 (0,72- 1,43)	0,93

**Nota:** IC= intervalo de confiança; PvDBP= *Duffy Binding Protein* de *Plasmodium vivax*; PvMSP= proteína de superfície de merozoítos de *Plasmodium vivax*.

#### 4.7 Anticorpos de inibição de ligação naturalmente adquiridos

A variante de PvDBPII Sal I foi utilizada para indicar a presença de anticorpos capazes de inibir a ligação entre essa proteína e nDARC-Fc em 572 amostras de plasma oriundas de 263 indivíduos, através do ensaio de inibição de ligação baseado em microplaca.

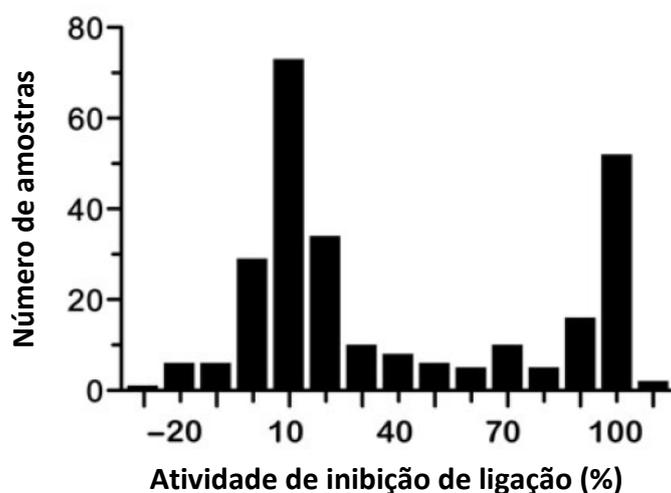
Para tanto, os níveis de respostas de anticorpos anti-PvDBP do ensaio multiplex baseado em microesferas foram divididos em quartis, de forma que todas as amostras que integravam o primeiro e o segundo quartis (com níveis de respostas mais alto e o seguinte) foram testadas. Ao total, cada indivíduo contribuiu com 1 a 7 amostras, e 47,9% (126) deles possuíram duas ou mais amostras testadas.

A atividade de inibição de ligação foi expressa em porcentagem de bloqueio/ inibição de ligação entre PvDBPII Sal I e nDARC-Fc. Uma amostra foi considerada com alta atividade inibitória quando inibiu acima  $\geq 80\%$  a ligação entre PvDBPII Sal I e nDARC-Fc. Portanto,

anticorpos inibitórios foram encontrados em 27,8% (159) das amostras avaliadas, sendo que 23,2% (133) delas possuíam capacidade de inibição de ligação  $\geq 90\%$ .

A distribuição da frequência dos níveis de anticorpos de inibição de ligação entre PvDBP Sal I e nDARC-Fc, utilizando a primeira amostra inserida no estudo dos 263 indivíduos foi claramente bimodal (Figura 25), com picos de 0-10% e 90-100% de inibição. Esses dados revelam que anticorpos IgG anti-PvDBP Sal I da população estudada são inibitórios ou não, restando apenas poucos distribuídos uma zona intermediária entre 10% e 90% de atividade inibitória. Resultados semelhantes foram obtidos quando em uma segunda análise inserimos todas as 572 amostras avaliadas para a presença de anticorpos inibitórios (dados não mostrados).

**Figura 25-** Distribuição da frequência de porcentagem de inibição de ligação entre anticorpos IgG anti-PvDBP e nDARC-Fc em 263 indivíduos do assentamento rural Remansinho, no estado do Amazonas, Brasil.



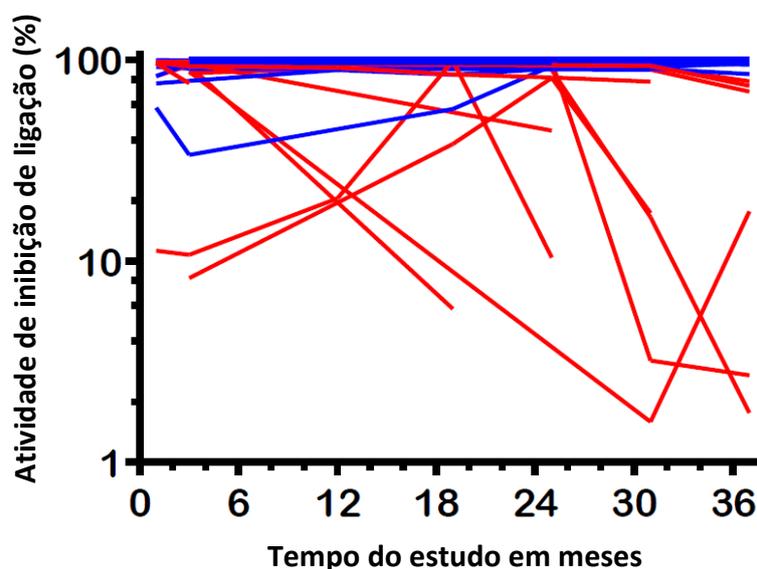
Níveis de anticorpos com inibição de ligação de PvDBP Sal I a nDARC-Fc correlacionam-se de maneira positiva com níveis de anticorpos IgG para todas as variantes de PvDBP Sal I (Tabela 11), sugerindo que quanto mais altos são os níveis de anticorpos para qualquer uma das variantes testadas, maiores as atividades de inibição de ligação. Além disso, esses anticorpos com atividade inibitória correlacionam-se fracamente, mas de maneira positiva, com a idade dos indivíduos ( $\rho = 0,243$ ;  $P = 0,001$ ).

**Tabela 11** – Coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) para correlação entre níveis de anticorpos inibitórios e níveis de anticorpos naturalmente adquiridos contra variantes de *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* em indivíduos do assentamento rural Remasinho, no estado do Amazonas, Brasil.

Variante	Coeficiente de Spearman ( $\rho$ )	<i>P</i>
PvDBP Sal I	0,554	< 0,0001
PvDBP AH	0,626	< 0,0001
PvDBP C	0,594	< 0,0001
PvDBP O	0,604	< 0,0001
PvDBP P	0,619	< 0,0001

Para avaliar se anticorpos inibitórios perdem sua capacidade de inibição no decorrer do tempo, as amostras de 43 participantes do estudo que possuíam mais de uma amostra testada para essa metodologia (e com pelo menos uma delas apresentando acima de 80% de capacidade inibitória) foram analisadas. Cada indivíduo colaborou com 2 a 6 amostras, durante os 37 meses. Trinta deles (69,8%) mantiveram suas atividades inibitórias  $\geq 80\%$  em todas as avaliações subsequentes (Figura 26, linhas azuis). Somente 13 participantes apresentaram redução para  $\leq 80\%$  da atividade de inibição de ligação (Figura 26, linhas vermelhas), durante o tempo de estudo, conforme mostra a Figura 26.

**Figura 26**– Avaliações sequenciais de atividade de inibição de ligação de anticorpos naturalmente adquiridos para *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* (PvDBP) de 43 participantes do estudo que tiveram pelo menos um registro de atividade inibitória acima de 80%.



Esses resultados indicam que quando adquiridos, anticorpos inibitórios tendem a persistir por meses, mesmo na ausência de repetidas exposições ao parasita.

#### 4.8 Reatividade variante-específica de anticorpos de inibição de ligação naturalmente adquiridos

Cento e sessenta e quatro amostras de plasma de 77 indivíduos que possuíam anticorpos IgG com atividade inibitória de aproximadamente 80% para PvDBP Sal I foram selecionados para avaliar se eram variante-específicos. Cada participante contribuiu com 1 a 7 amostras. Para tanto, os plasmas foram diluídos seriadamente começando na diluição de 1:20 e terminando com 1:640, a fim de comparar os títulos de anticorpos inibitórios contra as variantes de PvDBP Sal I, P e C.

A maioria das amostras de plasma (140 entre Sal I e P [85,4%], 146 entre Sal I e C [89%]; e 146 entre P e C [89%]) mostraram similar atividade inibitória de ligação contra cada variante apesar da divergência apresentada nas sequências do domínio II de PvDBP (Tabela 7). As amostras com anticorpos inibitórios variante-transcendentes são indicadas por quadrados pretos na Figura 27; os números em seu interior indicam o número de amostras com títulos

idênticos ou semelhantes (até uma diluição de diferença, por exemplo 1:20 vs. 1:40) contra um par de antígenos.

Algumas amostras (17 entre Sal I e P [10,3%], 17 entre Sal I e C [10,3%]; e 15 entre P e C [9,1%]), representadas nos quadrados cinzas da Figura 27, apresentaram títulos de inibição variando em duas diluições (por exemplo, 1:20 vs. 1:80). Nesses casos, os anticorpos foram definidos como moderadamente variante-específicos.

Poucas amostras (7 entre Sal I e P [4,3%], 1 entre Sal I e C [0,6%]; 3 entre P e C [1,8%]) apresentaram títulos de anticorpos inibitórios claramente variante-específicos. Nesses casos, os títulos entre pares de variantes diferiam em mais de duas diluições seriadas (por exemplo, 1:20 vs. 1:160); essas amostras são representadas em quadrados brancos na Figura 27.

Esses resultados indicam que uma vez adquiridos, anticorpos anti-PvDBPII com altos níveis atividade inibitória são na sua maioria, variante-transcendentes - ou seja, reconhecem indistintamente variantes distintas de PvDBPII.

**Figura 27** – Comparação por pares de títulos de anticorpos com atividade inibitória para *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* em indivíduos do assentamento rural no estado do Amazonas, Brasil.

		Títulos para Sal I						
		<20	20	40	80	160	320	640
Títulos para P	<20	6	14	7		1		
	20	2	6	8	4	1		
	40		1	9	10	2	1	
	80			1	10	14	3	4
	160					4	6	1
	320					1	6	9
	640						1	32

		Títulos para Sal I						
		<20	20	40	80	160	320	640
Títulos para C	<20	3	16	4				
	20		4	5	2			
	40	5	1	15	8	2		
	80				14	10	1	
	160					7	2	3
	320			1		4	11	6
	640						3	37

		Títulos para P						
		<20	20	40	80	160	320	640
Títulos para C	<20	16	6	1				
	20	2	7	1	1			
	40	9	8	13	1			
	80			7	18			
	160				7	4	1	
	320	1		1	4	7	9	
	640				1		6	33

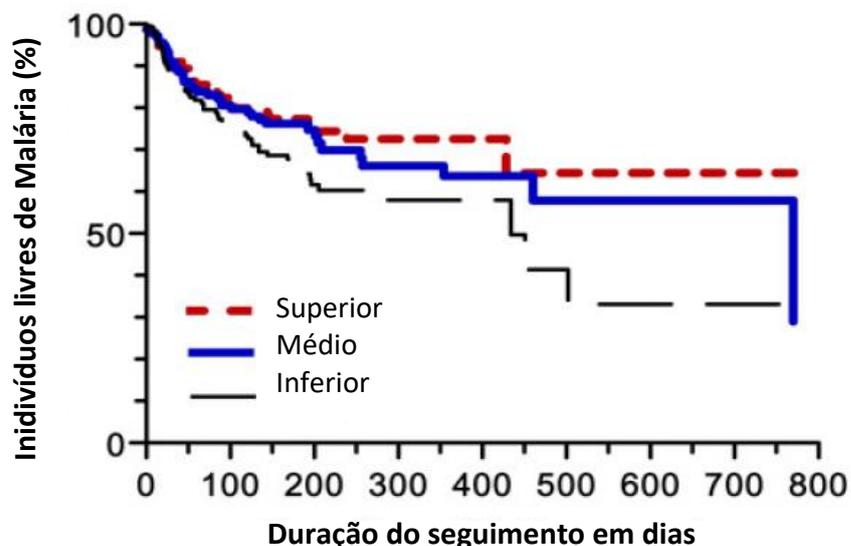
**Nota:** O primeiro painel representa as comparações entre variante Sal I (colunas) e P (linhas). No painel do meio, se encontram as comparações entre Sal I (colunas) e C (linhas). No painel inferior, variante P (colunas) e C (linhas). As amostras com anticorpos inibitórios variante-transcendentes são indicadas por quadrados pretos (até uma diluição de diferença) contra um par de antígenos. Os quadrados cinzas apresentaram títulos de inibição variando em duas diluições; nesses casos, os anticorpos foram definidos como moderadamente variante-específicos. Nos quadrados brancos, os títulos entre pares de variantes diferem em mais de duas diluições seriadas; são os anticorpos variante-específicos. Os números no interior de cada quadrado indicam o número de amostras com títulos idênticos ou semelhantes.

#### 4.9 Anticorpos de inibição de ligação e risco prospectivo de malária vivax

Para avaliar se indivíduos que apresentam anticorpos inibitórios são protegidos de malária clínica causada por *P. vivax*, 229 participantes do estudo DARC positivos e sem diagnóstico de malária no momento da coleta foram divididos em tercís de acordo com a capacidade de inibição de ligação dos seus anticorpos: superior ( $\geq 50\%$  de atividade inibitória), médio (6% - 49%) e inferior ( $< 6\%$ ) e seguidos durante os 37 meses do estudo. A unidade de análise foi o período de observação (em dias) entre o início do estudo e a próxima avaliação de atividade de inibição de ligação dos anticorpos, o primeiro episódio de malária vivax ou a data quando o indivíduo deixou o estudo, quaisquer viesse primeiro. Cada indivíduo contribuiu com 1 a 6 períodos de observação, 456 avaliações de atividade de inibição de ligação dos anticorpos (152 em cada tercil) foram incluídas na análise e ocorreram 126 eventos de malária (33, 39 e 54, nos tercís superior, médio e inferior, respectivamente).

A análise de sobrevivência revelou um atraso no tempo decorrido para episódio de malária vivax entre os indivíduos com anticorpos inibitórios nos tercís superior e médio, quando comparados com aqueles do tercil inferior, conforme mostra a Figura 28.

**Figura 28** – Curva de Kaplan-Meier mostrando a proporção de indivíduos que permaneceram livres de malária vivax clínica confirmada por microscópio durante o estudo, de acordo com os níveis de atividade inibitória dos anticorpos anti- PvDBP.



O modelo de hazards proporcionais de Cox, ajustado para idade, sexo e genótipo DARC, mostrou uma redução de 41-42% do risco de malária clínica entre indivíduos com respostas inibitórias nos tercils superior e médio, em relação àqueles do tercil inferior (Tabela 12). Idade (em anos) foi outro preditor independente de redução de risco de malária vivax clínica no modelo de Cox ajustado (razão de hazards: 0,98; intervalo de confiança de 95%: 0,97-1,00;  $P= 0,005$ ), sugerindo que fatores relacionados à idade, além de presença de anticorpos com atividade de inibição de ligação, são associados com proteção. O sexo feminino foi independentemente associado com aumento de risco de malária, após o ajuste com anticorpos inibitórios, porém não encontramos explicação para esse achado (razão de hazards: 1,45; intervalo de confiança de 95%: 1,01-2,08;  $P= 0,04$ ).

Interessantemente, o modelo de Cox não revelou interação significativa entre genótipo DARC e atividade de inibição de ligação (valores de  $P$  variando entre 0,27 e 0,98). Em um estudo prévio, realizado por King et al. (2011), anticorpos anti-PvDBP revelaram melhor atividade de inibição de ligação entre PvDBP e hemácias Duffy Fy<sup>a</sup>, comparadas com hemácias Fy<sup>b</sup>.

**Tabela 12** – Associação entre atividade de inibição de ligação de anticorpos naturalmente adquiridos para PvDBP e risco prospectivo de malária vivax clínica nos indivíduos do estudo.

Cox model	Tercil médio vs tercil inferior de atividade Inibitória		Tercil superior vs tercil inferior de atividade inibitória	
	Razão de hazards (95% de IC)	$P$	Razão de hazards (95% de IC)	$P$
Sem ajuste	0,59 (0,39 – 0,90)	0,01	0,51 (0,33 – 0,79)	0,003
Ajustado para idade	0,62 (0,41 – 0,94)	0,02	0,59 (0,38 – 0,93)	0,02
Ajustado para gênero	0,57 (0,43 – 0,97)	0,04	0,48 (0,37 – 0,86)	0,008
Ajustado para genótipo DARC	0,56 (0,37 – 0,86)	0,008	0,54 (0,34 – 0,84)	0,007
Ajustado para todas as variáveis acima	0,58 (0,38 – 0,89)	0,01	0,59 ( 0,37 – 0,93)	0,02

**Nota:** IC= intervalo de confiança; PvDBP= *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*; PvMSP= proteína de superfície de merozoítos de *Plasmodium vivax*.

Todos os resultados apresentados até aqui foram publicados por Nicolete et al. (2016) e uma cópia do artigo se encontra nos Anexos desta tese.

#### 4.10 Produção de anticorpos monoclonais recombinantes específicos para PvDBPII

##### 4.10.1 *Sorting de células B de memória antígeno-específicas*

Para a coleta das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), foram selecionados indivíduos que em ao menos um inquérito transversal tivessem anticorpos com alta capacidade de inibição ( $\geq 80\%$ ) de ligação entre nDARC-Fc e PvDBP Sal I. Após uma busca na região de estudo, em abril/2015, apenas sete participantes com essa característica ainda eram moradores do local e todos forneceram amostras de sangue e plasma. Então, para avaliar se esses indivíduos ainda possuíam anticorpos IgG capazes de inibir a interação entre nDARC-Fc e PvDBP, um novo ensaio de inibição de ligação baseado em microplaca foi realizado.

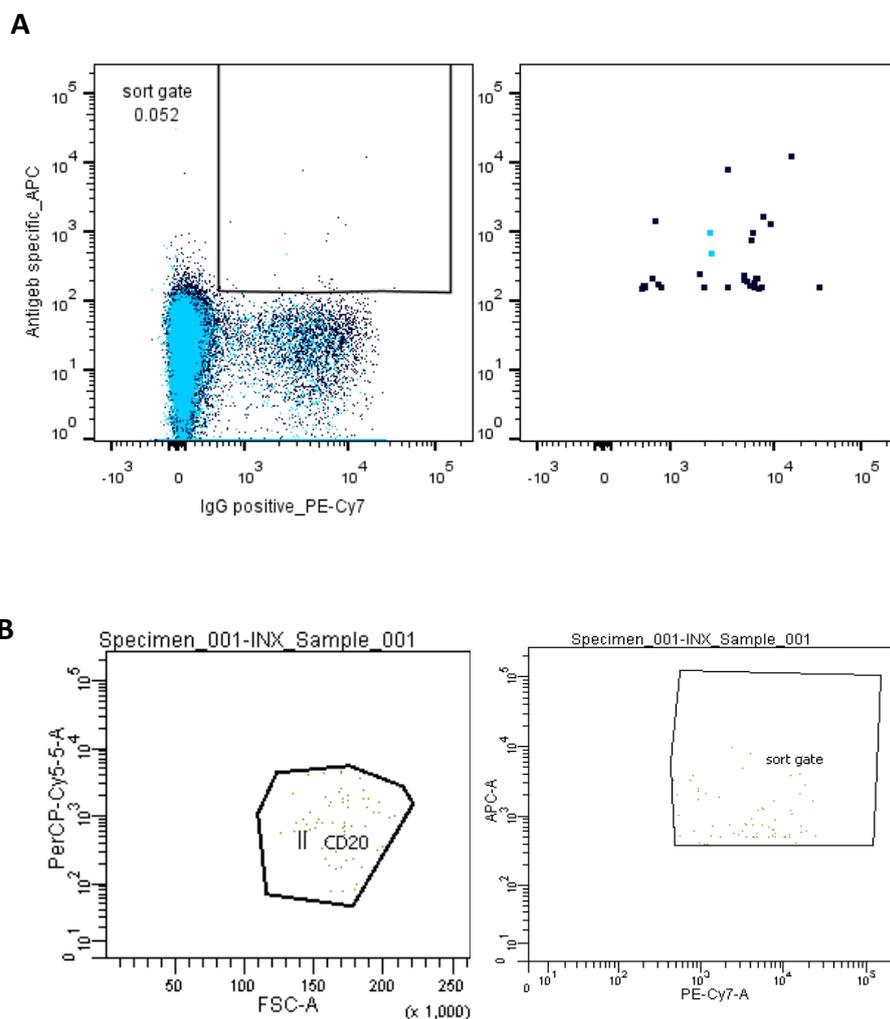
Conforme mostra a Tabela 13 todos os indivíduos doadores de PBMCs ainda possuíam respostas inibitórias contra a variante PvDBP Sal I, tornando essas amostras aptas ao processo de *sorting* de células B específicas para essa variante.

**Tabela 13** - Capacidade de inibição da interação entre nDARC-Fc e PvDBP Sal I dos indivíduos com células sanguíneas mononucleares periféricas coletadas.

Registro da amostra	% inibição de ligação
51	99,2 %
53	85,3 %
66	94,3 %
208	98,61 %
209	100 %
213	97,2 %
240	100 %

A partir disso, aleatoriamente, as amostras de PBMCs identificadas como 208 e 53 foram selecionadas para *sorting* de células B de memória, utilizando a variante Sal I para “pescar” apenas aquelas capazes de reconhecer esse antígeno (Figura 29). Do indivíduo 208 foi possível obter 31 células IgG+, CD20+, CD19+, PvDBP II Sal I+. Do 53, em que o *sorting* foi realizado posteriormente e sob mesmas condições foram obtidos 64 células IgG+, CD20+, CD19+, DBP II Sal I+. Cada célula B de memória antígeno- específica foi adicionada em um poço de placa com 96 poços e congeladas a -80 °C até a síntese de cDNA das mesmas.

**Figura 29** – Local do *sorting-gate* para células IgG+, CD20+, CD19+, PvDBP II Sal I+ da amostra 208 (A) e amostra 53 (B)



#### 4.10.2 Obtenção do anticorpo monoclonal anti-PvDBP Sal I

Os processamentos iniciais dos noventa e cinco poços contendo células B específicas para PvDBP Sal I das duas amostras foram realizados em momentos diferentes para evitar ao máximo contaminação cruzada.

O cDNA das 95 células B oriundas do *sorting* deram origem a 27 pares de cadeia Igγ (pesada) e cadeia IgL (leve, contando cadeias λ ou κ). Esses pares passaram por processo de digestão, ligação, transformação e sequenciamento, a fim de que fossem selecionados apenas os clones.

Vinte e dois clones foram indicados para transfecção por plasmídeos em células HEK293H visando à obtenção de anticorpos monoclonais específicos. Os sobrenadantes desses 22 pares, após a cultura, revelaram a presença de anticorpos IgG através de ELISA. Nesses, o próximo passo foi a detecção de anticorpos anti-PvDBP II Sal I também por ELISA, que apontou apenas 1 (um) desses anticorpos monoclonais gerados como capaz de reconhecer a proteína que foi realizado o *sorting*.

A partir de então, iniciou-se a caracterização do primeiro anticorpo monoclonal humano gerado a partir de células B de indivíduo morador da região amazônica brasileira, a reconhecer a variante da região II da *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*, Sal I. O anticorpo monoclonal (mAb) expresso pertence a subclasse IgG1 e seu número de identificação é 134/135 e foi expresso a partir do *sorting* de células B do indivíduo 53.

A descrição do anticorpo monoclonal brasileiro se encontra na Tabela 14 revelando o alelo das regiões variáveis, número de mutações, aminoácidos e comprimento da região CDR3.

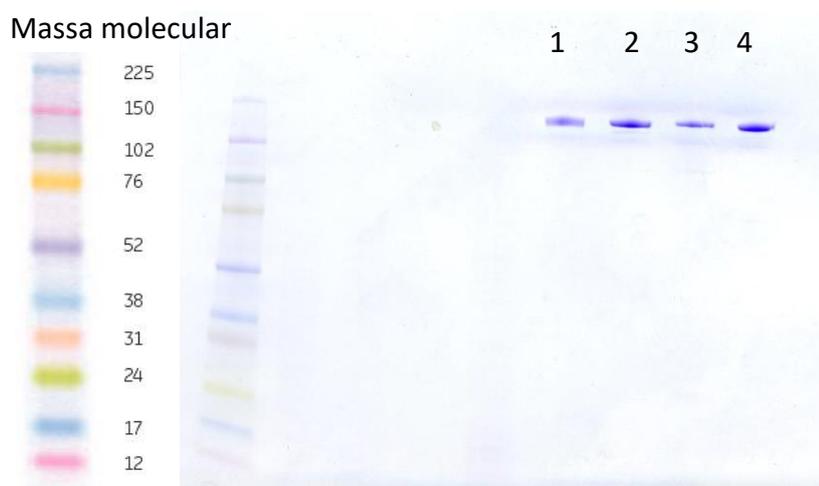
**Tabela 14**– Regiões variáveis do anticorpo monoclonal brasileiro expresso (134/135) específico para PvDBP Sal I

Cadeia pesada (I $\gamma$ )					
VH	D	JH	Mutação AA da região V	CDR3 – IMGT	Comprimento CDR3
1-24	1-26	3	6	ATDPGCTVGTPCFADFLL	18
Cadeia leve (I $\gamma$ k –kappa)					
V $\kappa$	J $\kappa$	Mutação AA da região V	CDR3 – IMGT	Comprimento CDR3	
1-39	2	4	QQSYGTPRT	9	

**Nota:** VH, do inglês *variable heavy chain*, V $\kappa$ , do inglês *variable kappa chain*, JH, *junction heavy chain* e J $\kappa$ , *junction kappa chain*. V, variável. AA, aminoácidos.

Após a purificação do anticorpo monoclonal em coluna Protein A HP Hitrap (GE Healthcare) um gel de poliacrilamida (12%) corado com Azul de Coomassie confirmou a presença de IgG purificado. A eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada com 4 alíquotas de 1  $\mu$ g do mAb 134/135. As quatro frações do anticorpo monoclonal expresso (1, 2, 3 e 4; Figura 30) possuem 150 kDa, massa molecular aparente esperada para imunoglobulinas IgG.

**Figura 30** – Gel de poliacrilamida realizado após a purificação do anticorpo monoclonal brasileiro anti-PvDBP 134/135.

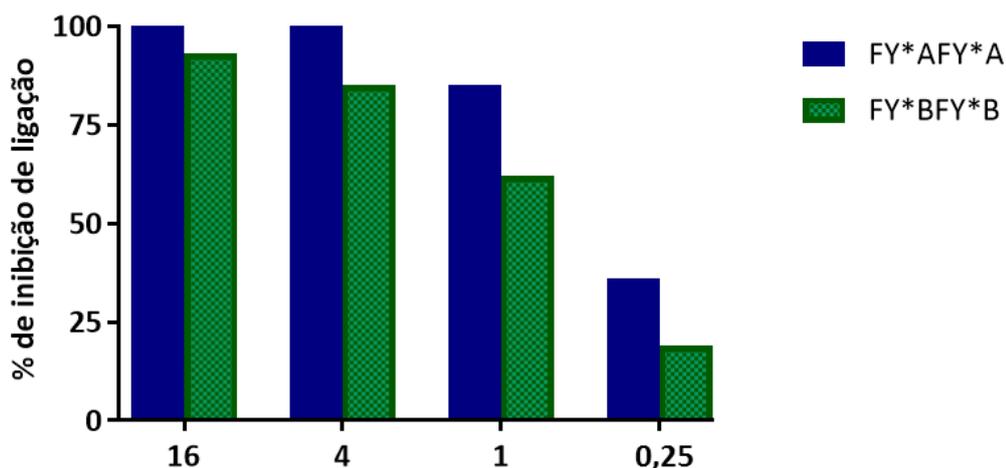


#### 4.10.3 Anticorpo monoclonal brasileiro e seu potencial de inibir a ligação entre PvDBP II Sal I e hemácias de diferentes genótipos DARC

Uma vez que o mAb expresso reconhece PvDBP Sal I em ELISA, o próximo passo foi avaliar se esse anticorpo é capaz de inibir a ligação entre DARC e PvDBP *in vitro*. Para tanto foram utilizadas hemácias de doadores FY\*AFY\*A e FY\*BFY\*B e distintas concentrações do anticorpo monoclonal: 16 µg/mL, 4 µg/mL, 1 µg/mL e 0,25 µg/mL. A variante de PvDBP II utilizada foi Sal I na concentração única de 1 µg/mL.

Foi possível observar uma maior capacidade de inibição de ligação entre PvDBP Sal I e hemácias FY\*AFY\*A em relação a FY\*BFY\*B, nas 4 diluições do anticorpo monoclonal (Figura 31). Tal fato também foi observado por King et al. (2011), que demonstraram que anticorpos inibitórios inibiram com mais eficiência a ligação entre PvDBP II e eritrócitos Fy<sup>a</sup>. Ocorreu inibição de ligação (> 80%) até a concentração de 1 µg/mL do mAb 134/135 para hemácias FY\*AFY\*A. Para a menor diluição do anticorpo monoclonal expresso (0,25 µg/mL) a atividade inibitória para ambos genótipos não é relevante.

**Figura 31** - Inibição de ligação de PvDBP Sal I em hemácias de diferentes genótipos DARC pelo anticorpo monoclonal anti-PvDBP II, nomeado 134/135.



Concentração do mAb 134/135 (µg/mL) para 1 µg/mL de PvDBP Sal I

#### 4.10.4 Competição por sítio de ligação em PvDBP entre anticorpo monoclonal expresso e anticorpos inibitórios naturalmente adquiridos

Cento e setenta amostras de plasma de indivíduos com anticorpos naturalmente adquiridos anti-PvDBP de alta capacidade inibitória, provenientes de 82 indivíduos de nossa área de campo (Remansinho), foram selecionados para avaliar se compartilham o mesmo sítio de ligação em PvDBP Sal I com o anticorpo monoclonal expresso contra essa variante. A fim de investigar a ocorrência de competição por epítopo de ligação (quando plasma e mAb estão juntos) e em qual diluição máxima do plasma essa competição ainda ocorre, os plasmas foram diluídos em cinco diferentes concentrações: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. As competições foram expressas em porcentagens; plasma e anticorpo monoclonal compartilham de mesmo epítopo (ou similar) em PvDBP II quando essa competição é  $\geq 80\%$ .

A Tabela 15 abaixo descreve a porcentagem de amostras que competem por epítopo de ligação em PvDBP entre diferentes diluições de anticorpos naturalmente adquiridos e o mAb brasileiro 134/135.

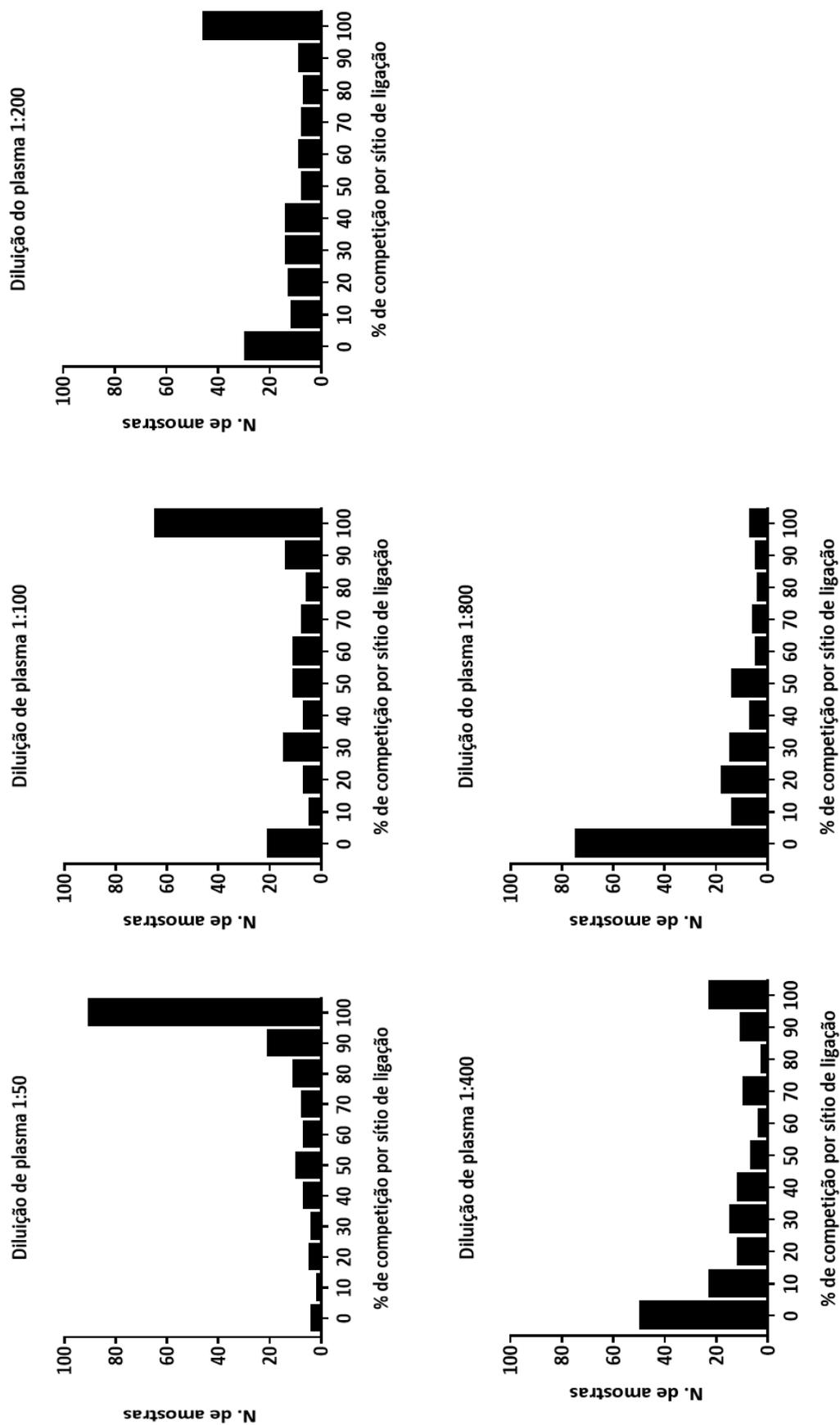
**Tabela 15** – Proporção de amostras de plasma de indivíduos do assentamento rural no estado do Amazonas, Brasil, que competem  $\geq 80\%$  pelo o mesmo sítio de ligação em PvDBP com o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135.

	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
$\geq 80\%$ de competição	72,3% (123)	50% (85)	36,5% (62)	21,7% (37)	9,4% (16)

**Nota:** Em parênteses encontram-se os números absolutos de amostras.

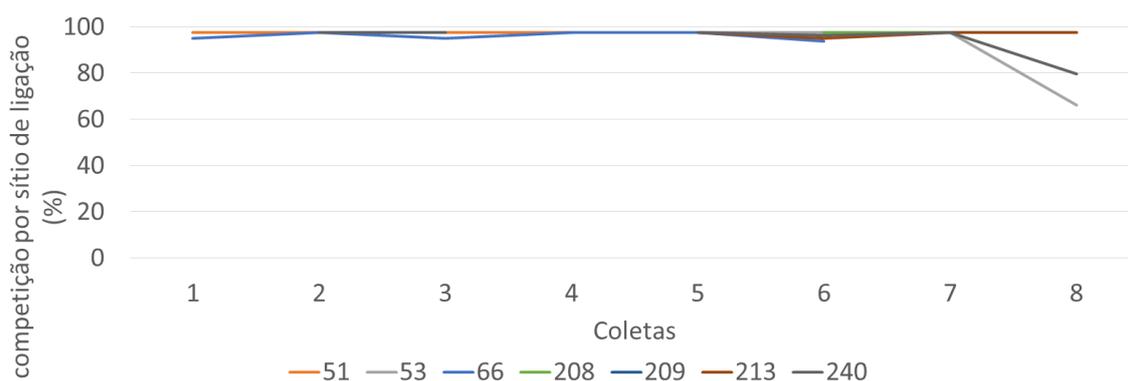
A distribuição da porcentagem de competição entre as diferentes diluições das amostras de plasma e o mAb expresso pode ser observada na Figura 32. Nota-se claramente a mudança de padrão na competição de acordo com aumento das diluições dos anticorpos naturalmente adquiridos. Na diluição de 1:50, a maior parte das amostras contendo anticorpos inibitórios concorrem com o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135 pelo mesmo sítio de ligação ou similar em PvDBP Sal I. Embora a maior parte das amostras contendo esses anticorpos não são capazes de competir pelo mesmo epítopo que o mAb 134/135 na maior diluição do plasma (1:800), algumas revelaram competição pelo mesmo epítopo tão forte que permaneceram disputando pelo mesmo epítopo em PvDBP Sal I após serem diluídas quatro vezes (Figura 32).

**Figura 32** – Porcentagem de competição por epítipo de ligação em PvDBP Sal I entre o anticorpo monoclonal brasileiro (134/135) e 170 amostras de plasmas apresentando anticorpos anti-PvDBP com alta atividade de ligação entre PvDBP Sal I em nDARC-Fc, em diferentes concentrações.



O plasma dos indivíduos que forneceram células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMCs, n=7) para o *sorting* de células B, também foram testados nesses ensaios de competição. Como se trata de indivíduos com maior número de amostras de plasma durante o estudo, foi possível avaliar se o padrão de competição varia ao longo do tempo. Cada indivíduo forneceu de 4 a 6 amostras de plasma e o elevado grau de competição entre esses anticorpos anti-PvDBP e o monoclonal brasileiro tende a persistir ao longo do tempo, como é possível observar na Figura 33. A competição começa a decair no momento da coleta de PBMCs (momento 8), que coincide com a ausência de casos de malária na região.

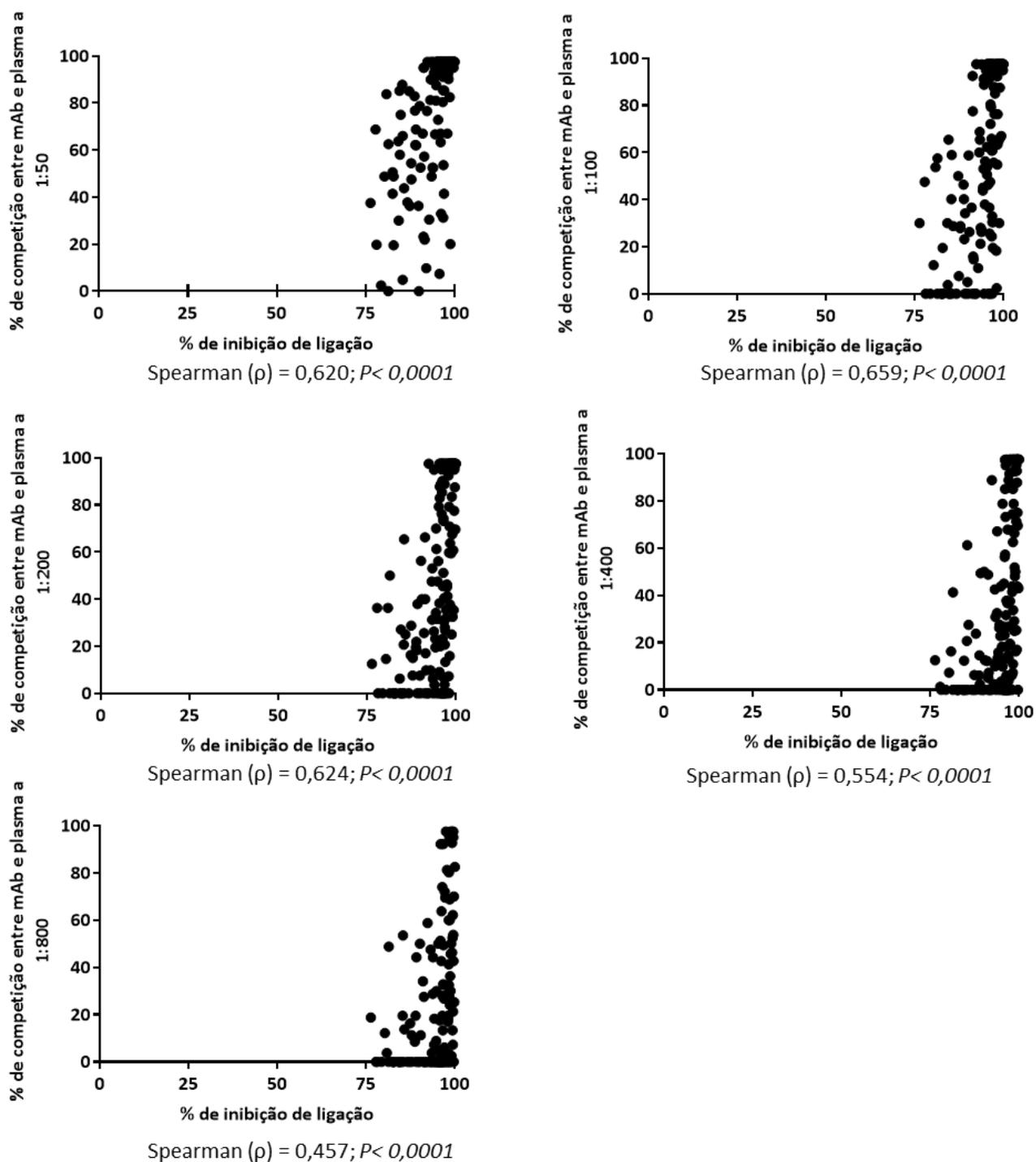
**Figura 33** – Persistência de competição por sítio de ligação (ou similar) em PvDBP Sal I entre plasmas com anticorpos de alta atividade inibitória e o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135, ao longo do estudo.



**Nota:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 se referem aos inquéritos transversais realizados no estudo entre março-2010 a maio-2013; 8 indica o momento em que foi realizada a coleta de PBMC. Os números com as cores correspondem aos indivíduos (RG) acompanhados nessa análise durante os inquéritos transversais. A concentração do plasma é 1:50.

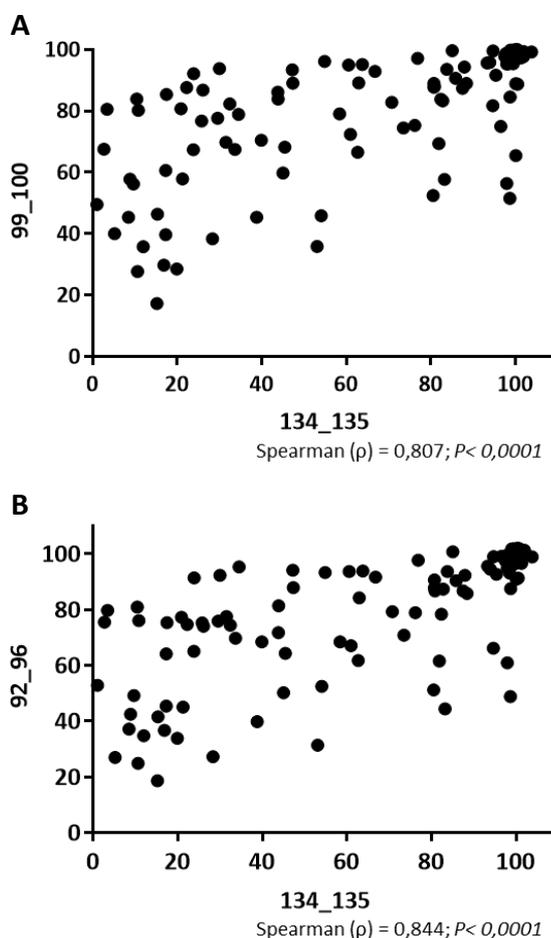
Anticorpos anti-PvDBP II naturalmente adquiridos com altos níveis de inibição de ligação correlacionam-se de maneira positiva com níveis de competição ( $\geq 80\%$ ) pelo epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal brasileiro 134/135 (coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) variando entre 0,659 e 0,457;  $P < 0,001$ , para todas as diluições de plasma), conforme mostra a Figura 34.

**Figura 34** – Correlação entre anticorpos anti- PvDBPII naturalmente adquiridos com alta capacidade de inibição de ligação entre PvDBP Sal I e nDARC e competição pelo mesmo epítopo (ou similar) de ligação em PvDBP Sal I com o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135. Os plasmas contendo os anticorpos anti-PvDBP naturalmente adquiridos foram diluídos em diferentes concentrações.



Quando níveis de competição entre amostras de plasma com alta atividade inibitória ( $n= 151$ ) e o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135 foram comparados com os níveis de competição entre esses mesmos plasmas e dois anticorpos monoclonais anti-PvDBPII provenientes de indivíduos do Camboja (expressos da mesma maneira que o anticorpo monoclonal brasileiro), foi possível observar uma forte correlação na capacidade de competição entre o anticorpo monoclonal brasileiro e os do Camboja, nomeados como 92/96 e 99/100 (Figura 35). O coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) revelou correlação de 0,807 entre o mAb brasileiro e o mAb do Camboja 99/100. Esse coeficiente ( $\rho$ ) de correlação entre níveis de competição do mAb brasileiro e o outro mAb do Camboja, nomeado 92/96 foi de 0,844. Tais dados sugerem que na maioria das amostras de plasma testadas ocorre competição pelo mesmo sítio de ligação entre os três anticorpos monoclonais anti-PvDBP testados e as amostras de plasma de indivíduos do Remansinho.

**Figura 35** – Correlação entre competição por sítio de ligação em PvDBP Sal I entre o anticorpo monoclonal anti-PvDBPII brasileiro (134/135) e os anticorpos monoclonais anti-PvDBPII do Camboja 99/100 (A) e 92/96 (B).

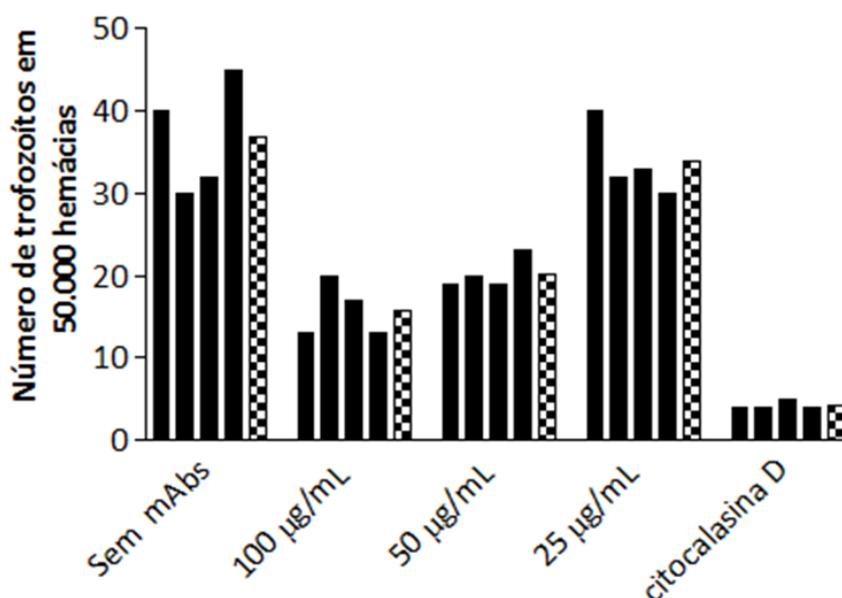


#### 4.10.5 Anticorpo monoclonal anti-PvDBP e ensaios de inibição de invasão ex-vivo

Com propósito de avaliar se o anticorpo monoclonal brasileiro é capaz de impedir a invasão do parasita em reticulócitos humanos foi realizado um ensaio de inibição de invasão *ex-vivo*, utilizando parasitas da região amazônica brasileira criopreservados e reticulócitos de indivíduos saudáveis enriquecidos do sangue total a partir da metodologia de centrifugação descrita no ítem 3.9.3.1.

Para a definição da concentração do mAb 134/135 a ser usada nos experimentos foi realizado um ensaio de invasão apenas com diferentes concentrações desse anticorpo monoclonal anti-PvDBP, iniciando-se com 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e o controle de invasão com citocalasina D (Figura 36). Poços com o mAb e controles foram testados em duplicata e de cada poço foram extraídas duas lâminas, ou seja, em cada poço-teste foram realizadas duas leituras, totalizando 4 leituras para a mesma concentração de mAb e controles. A contagem de 50.000 hemácias em cada lâmina revelou inibição dose-dependente e estabeleceu que a concentração de 100 µg/mL do anticorpo monoclonal brasileiro tem melhor inibição do parasita.

**Figura 36** – Inibição dose-dependente de invasão de *Plasmodium vivax* em reticulócitos.

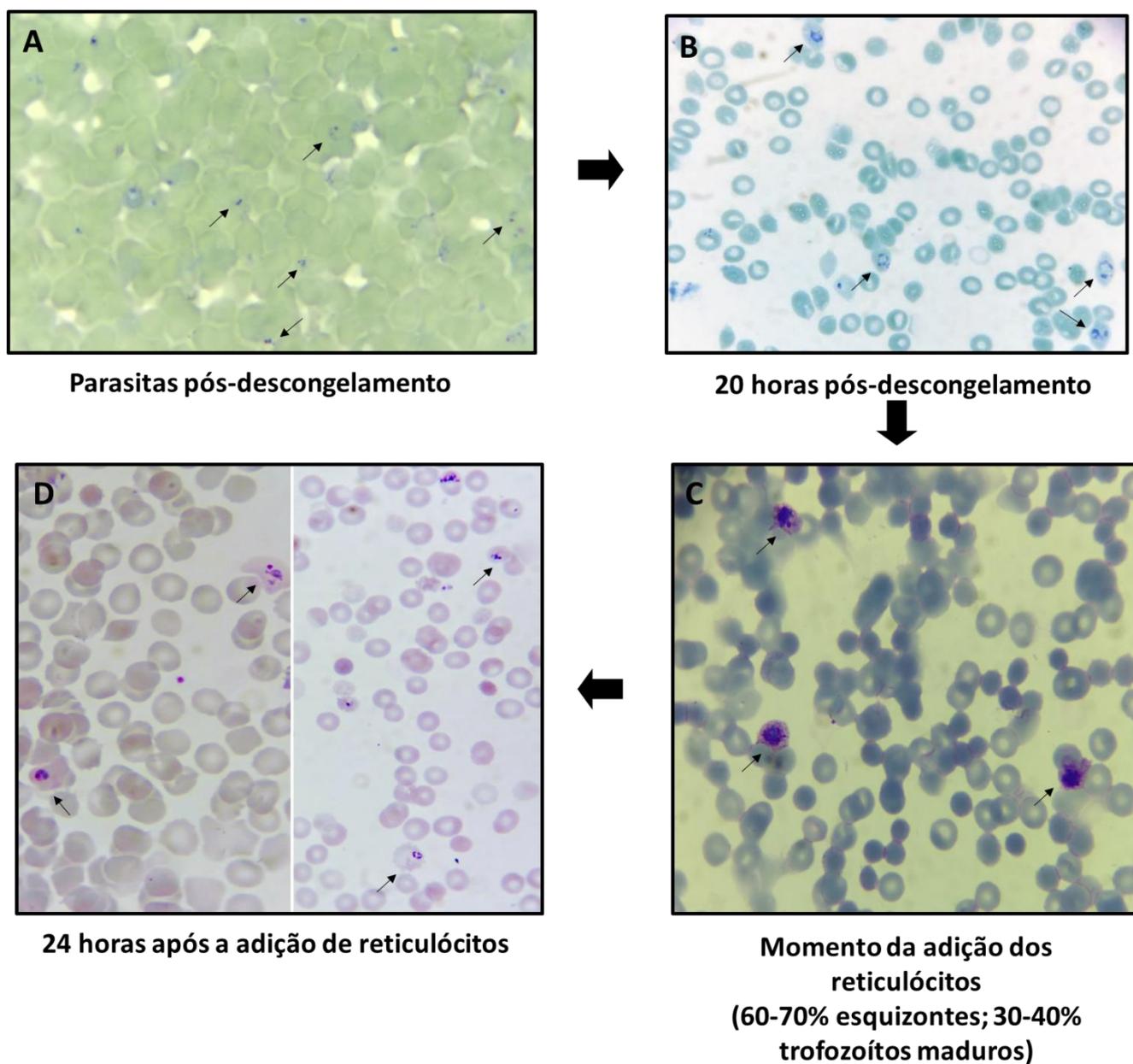


**Nota:** As barras em preto indicam a quantidade de parasitas em 2 poços-teste, sendo que cada poço forneceu duas lâminas de leitura. As barras quadriculadas indicam as médias de parasitemia para a concentração de mAb correspondente (100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL do mAb 134/135) e os poços-controle: sem adição de mAb e com citocalasina D (5 µg/mL).

O ensaio de inibição de invasão foi realizado com um isolado diferente do teste de concentração do anticorpo. Para esse experimento, foram feitas duplicatas com o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135 na concentração de 100 µg/mL, o mAb do Camboja 99/100 foi utilizado na concentração de 50 µg/mL como controle, assim como o anticorpo anti-toxóide tetânico 43/38, na mesma concentração que o mAb brasileiro (100 µg/mL). Citocalasina D a 5 µg/mL foi utilizada como controle de invasão. Vale ressaltar que todos os anticorpos monoclonais inseridos nestes experimentos foram obtidos através da mesma metodologia.

Nesse ensaio 20.000 hemácias foram contadas manualmente em cada lâmina, sendo novamente retirada de cada poço da duplicata duas lâminas de leitura, totalizando 4 lâminas para cada poço-teste ou controle. A parasitemia foi calculada baseada no número de parasitas contados/20.000 hemácias. Os reticulócitos (enriquecidos a 3,3%) foram adicionados cerca de 38-40h após o início da cultura (Figura 37, no momento C). A ilustração dos parasitas em cada etapa do ensaio encontra-se na Figura 37.

**Figura 37** – Ensaio de inibição de invasão de *Plasmodium vivax* em hemácias *ex vivo*.

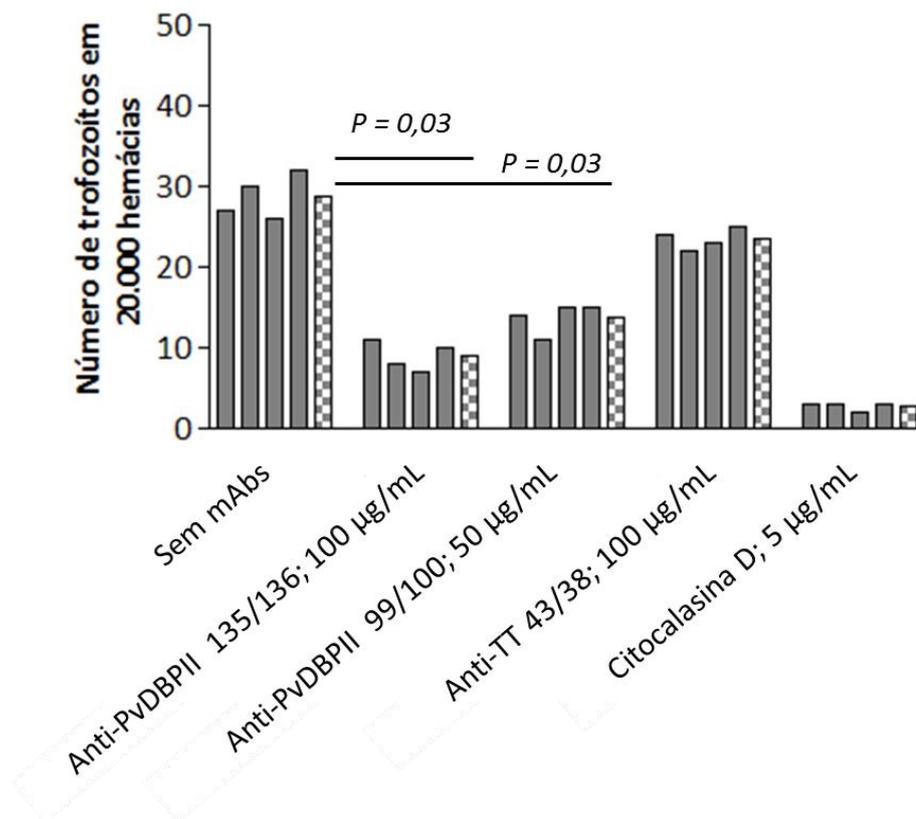


**Nota:** Em A, as hemácias estão parasitadas com formas de trofozoítos jovens logo após o processo de descongelamento e início da cultura dos parasitas. Nesse momento são adicionados aos parasitas os anticorpos monoclonais a serem testados nos poços-testes da cultura. Na Figura B é possível observar a evolução parasitária 20 horas após o descongelamento. A imagem C revela a presença de esquizontes jovens, momento em que os reticulócitos são adicionados para novas invasões. A partir de 24 horas depois é possível observar trofozoítos jovens; Figura D. As setas indicam as hemácias parasitadas.

O anticorpo monoclonal brasileiro expresso nesse trabalho (134/135) reduziu em 69% a invasão de hemácias e o anticorpo monoclonal anti-PvDBPII 99/100 do Camboja, 52% (ambos  $P = 0,03$ ; Teste U de Mann-Whitney); em relação ao controle sem adição de anticorpos (Figura 38).

Os anticorpos monoclonais 134/135 e 99/100 foram capazes de reduzir a entrada do parasita nos reticulócitos do doador em cultura, 62% e 41%, respectivamente, em relação ao controle Anti-TT (anti-toxóide tetânico) 43/38. A Figura 38 ilustra os resultados do ensaio de invasão e a Tabela 16 a parasitemia do ensaio.

**Figura 38** - Anticorpos monoclonais humanos anti-PvDBP Sal I inibem parcialmente a invasão de *Plasmodium vivax* em hemácias.



**Nota:** As barras em cinza indicam a quantidade de parasitas em 2 poços-teste, sendo que cada poço forneceu duas lâminas de leitura. As barras quadriculadas indicam as médias de parasitemia para a concentração de mAb correspondente (100 µg/mL para 134/135, 50 µg/mL para 99/100 e 100 µg/mL de Anti-TT 43/38) e os poços-controle: sem adição de mAb e com citocalasina D (5 µg/mL).

**Tabela 16** – Parasitemia do ensaio de inibição de invasão de *Plasmodium vivax* em reticulócitos humanos.

	Sem adição de mAb	mAb brasileiro (134/135)	mAb do Camboja (99/100)	mAb anti-toxóide tetânico	citocalasina D
Parasitemia	0,143%	0,045%	0,068%	0,12%	0,013%

## 5 DISCUSSÃO

A escolha de um antígeno para a formulação de uma vacina exige, no caso de doenças parasitárias como a malária, uma detalhada compreensão do perfil de resposta que esse antígeno provoca em indivíduos naturalmente expostos a diferentes níveis de transmissão da doença. Nesta tese, demonstramos que a *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*, apesar de liberada apenas no momento da invasão de merozoítos nos reticulócitos e interagir somente com eritrócitos que expressam DARC em sua superfície, é imunogênica em uma população de um assentamento agrícola localizado na Amazônia brasileira, considerado um local de baixa endemicidade.

Neste trabalho, empregamos uma nova tecnologia de imunoenaios baseados em microesferas, que nos permitiu avaliar a presença de anticorpos para diferentes proteínas ao mesmo tempo. Um ponto a ressaltar é que as variantes de PvDBPII utilizadas nos experimentos desta tese passaram por processo de redobramento extra durante sua síntese, com propósito de que a exposição de seus epítomos fosse otimizada (SINGH et al., 2001).

### 5.1 Anticorpos anti-PvDBP naturalmente adquiridos

Nesse estudo realizado com 466 indivíduos moradores de região endêmica na Amazônia brasileira, encontramos entre 62,4% e 85,6% de respondedores para diferentes variantes de PvDBP. Sem dúvida, é um dos maiores números de respondedores para essa proteína já encontrado em estudos com população de assentamento rural na região amazônica brasileira. A soroposidade para PvDBP girou em torno de 20% em um assentamento agrícola no estado Acre (SOUZA-SILVA et al., 2010) e 49,5% em outra comunidade rural no Amazonas (KANO et al., 2012). Vale ressaltar que uma das diferenças entre esses dois estudos está na constituição de cada população. Souza-Silva et al. (2010) avaliou o perfil de respostas em uma comunidade formada por indivíduos oriundos de regiões consideradas não endêmicas do Brasil. Já Kano et al. (2012), analisou anticorpos IgG anti-PvDBP em uma população que tem em média 19 anos de residência em região amazônica, o que poderia justificar a diferença encontrada no número de respondedores. Na Colômbia, em uma aldeia localizada em região de transmissão instável, o número de pessoas com anticorpos anti-PvDBP foi de 40% (MICHON et al., 1998).

A população do Remansinho é constituída por indivíduos provenientes de outros assentamentos rurais dentro Amazônia e a proporção de indivíduos com anticorpos anti-PvDBP Sal I encontrada (64,4%) foi semelhante à detectada por Cerávolo et al. (2005), em que 65% dos mineradores que viveram 17 anos em região endêmica foram capazes de produzir resposta contra PvDBP Sal I. Essa variante também foi altamente imunogênica em um estudo conduzido por Tran et al. (2005), em três comunidades no estado de Rondônia: Colina, Ribeirinha e Buritis, que possuem populações com comparáveis médias de idade, mas são epidemiologicamente distintas, diferindo no tempo de residência em região amazônica, números de episódios prévios de malária e de indivíduos com infecção patente. Entre os moradores de Buritis, 43% foram capazes de produzir anticorpos anti-PvDBP, já em Colina e Ribeirinha, 70% dos moradores possuíam esses anticorpos. Vale ressaltar que nesse estudo, os autores utilizaram a variante de PvDBP Sal I *refolded*, que passou pelo processo de redobramento descrito por Singh et al. (2001), assim como a proteína utilizada para avaliar as respostas de anticorpos do Remansinho.

Possivelmente, a proporção de respondedores para PvDBP na maioria dos estudos citados acima poderia ser maior se esses grupos utilizassem variantes com esse redobramento adicional, uma vez que essas proteínas possuem propriedades ligantes funcionais semelhantes as encontradas na PvDBP nativa.

## **5.2 Prevalência de anticorpos anti-PvDBP de acordo com a idade**

Assim como em outros estudos envolvendo respostas de anticorpos anti-PvDBP em regiões endêmicas, a prevalência de respondedores para variantes dessa proteína neste trabalho, aumentou linearmente de acordo idade do indivíduo e os níveis de resposta para cada proteína correlacionaram-se positivamente com a idade. O estudo de Kano et al. (2012), no assentamento rural composto por indivíduos que residem em região amazônica durante muitos anos, a idade foi o único preditor significativamente associado com a presença de anticorpos anti-PvDBP, sendo que cada ano adicional (na idade) aumentou 5% a probabilidade do indivíduo possuir anticorpos contra essa proteína. Estudos em Papua Nova Guiné (FRASER et al., 1997) e Colômbia (MICHON et al., 1998) também revelaram aumento no número de respondedores de acordo com a idade. Em populações compostas por indivíduos com longo

tempo de residência em região endêmica, a idade acaba refletindo os anos de exposição acumulativa à malária.

Nos levantamentos conduzidos por Souza-Silva et al. (2010) e Cerávolo et al. (2005), anos de residência em região amazônica, e não a idade do indivíduo, foram um forte preditor para a presença de anticorpos IgG anti-PvDBP, demonstrando que a exposição acumulativa é determinante para a geração dessas respostas. Tran et al. (2005) também relataram que a soroprevalência para essa proteína em Buritis, Colina e Ribeirinha aumentou com anos de residência em região endêmica, sendo que o maior número de respondedores se encontravam entre aqueles com mais de 30 anos de moradia em área endêmica.

### **5.3 Diversidade de sequência e anticorpos anti-PvDBP cepa-transcendentes**

Nenhuma variante utilizada como antígeno foi encontrada circulando na área de estudo, embora levantamentos realizados no Acre mostrem a presença da cepa de referência Sal I, com relativamente baixa frequência por Souza-Silva et al. (2010) e Souza et al. (2010) (em torno de 10% nos dois estudos), porém altamente prevalente em um estudo no Amazonas, em que mais da metade dos parasitas sequenciados (52,17%) pertenciam a esse haplótipo (KANO et al., 2012). Em Papua Nova Guiné a frequência dessa variante foi de 0,7% em um estudo envolvendo crianças de 5 a 14 anos. Nesse estudo de PNG, variante AH foi a mais prevalente com frequência de 26%, seguida de PvDBP O (20,4%), PVDBP P (10,4%) e por último PvDBP C (1,3%) (COLE-TOBIAN et al., 2009).

Até o momento, sequências da região II de PvDBP foram obtidas de diferentes países, incluindo Papua Nova Guiné (COLE-TOBIAN et al., 2007; TSUBOI et al., 1994), Colômbia (AMPUDIA et al., 1996), Tailândia (GOSI et al., 2008), Brasil (SOUZA et al., 2006; 2010), entre outros. Esses estudos revelam que os principais resíduos polimórficos na região II de PvDBP (F306L, R308S, D384G, K386N, R390H, N417K, L424I, W437R e I503K) ocorrem dentro do domínio de ligação da proteína, porém não interferem na identificação do seu receptor na membrana dos eritrócitos (VANBUSKIRK et al., 2004a). Apesar disso, alguns deles (N417K, W437R e I503K) podem alterar o reconhecimento imune de PvDBP conforme VanBuskirk et al., (2004b). Em concordância com esses autores, Chootong et al. (2010; 2012) reafirmam que polimorfismos genéticos em PvDBPII podem alterar o caráter antigênico dessa proteína e

conferir mudanças significativas nas funções inibitórias de anticorpos anti-PvDBP neutralizantes, levando a produção de anticorpos específicos para cada variante.

No presente trabalho, os haplótipos encontrados no Remansinho possuem diferentes combinações de aminoácidos entre as posições 417, 437 e 503; assim como as variantes testadas (AH, C e P) apresentam os polimorfismos 417N, 437R e 503K. De qualquer forma, as substituições desses aminoácidos não geraram grande impacto no reconhecimento da proteína por anticorpos naturalmente adquiridos, oriundos de uma população que muito provavelmente nunca sofreu exposição à essas variantes. Esses dados corroboram com o encontrado por Valizadeh et al. (2014), que para verificar se anticorpos contra variantes de PvDBP de indivíduos do Irã reagiam cruzadamente ou eram cepa-específicos, realizaram um experimento de imuno-depleção através ELISA, com 20 indivíduos infectados (cada um infectado por um haplótipo de PvDBP, mas com infecções anteriores causadas por outras variantes) e 5 haplótipos de PvDBPII, como antígenos. O estudo revelou uma mínima atividade cepa-específica para alguns alelos de PvDBPII e confirmou um alto nível de anticorpos que em reação cruzada reconhecem várias variantes. Assim como nas amostras do Remansinho, as respostas de anticorpos anti-PvDBP para diferentes variantes desse estudo do Irã correlacionaram-se de forma positiva entre si, sugerindo o reconhecimento de epítomos compartilhados entre as diferentes variantes testadas.

Um outro trabalho realizado por esse mesmo grupo, também no Irã, com indivíduos infectados, revelou a presença de 9 haplótipos circulantes. Os haplótipos mais e menos prevalentes foram selecionados para ELISA com plasmas desses indivíduos, que revelaram o mesmo nível de resposta anti-PvDBP para ambas variantes. Nesse estudo, a região II de PvDBP de ambas, diferenciavam-se entre si por substituições de 9 aminoácidos, que não foram capazes de alterar o reconhecimento desses anticorpos. Apesar desses indivíduos reconhecerem variantes que circulam na região, o que não acontece no nosso estudo, possivelmente esses anticorpos foram capazes de reconhecer epítomos conservados e comuns, em ambas proteínas.

Cole-Tobian et al. (2009), no estudo com crianças de Papua Nova Guiné, também registraram a presença de anticorpos cepa-transcendentes, uma vez que 49% das crianças com menos de 8 anos possuíam anticorpos anti-PvDBP para todas as variantes testadas, incluindo Sal I, haplótipo com frequência mais baixa no estudo. Essa proporção aumentou de acordo com a idade (exposição a diferentes variantes ao longo do tempo), sendo que no grupo

de crianças entre 12 e 14 anos, a maioria deles eram capazes de reconhecer todas as proteínas.

Vale ressaltar que a presença de anticorpos cepa-transcendentes não significa que esses possam ser protetivos ou inibitórios, o que será discutido nos itens 5.4 e 5.6, respectivamente.

#### **5.4 Níveis de anticorpos anti-PvDBP naturalmente adquiridos durante o estudo e proteção contra malária vivax clínica**

Os níveis de anticorpos anti-PvDBP Sal I e anti-PvMSP-1<sub>19</sub> espelharam as mudanças na prevalência de *P. vivax* durante o tempo do estudo. Essa flutuação de anticorpos contra PvDBP de acordo com a transmissão de malária, também foi observada por Souza-Silva et al. (2010; 2014) com amostras de assentamento rurais no Acre e Amazonas. O aumento acentuado dos níveis de anticorpos para essas proteínas no Remansinho foi devido a um surto na região, causado por expansão clonal de um ou poucos haplótipos de parasitas geneticamente relacionados em outubro-novembro/2011 (BATISTA et al., 2015).

A capacidade de *boosting* desses anticorpos foi verificada individualmente após episódio de malária confirmado por microscopia revelando aumento dos níveis de anticorpos para todas as variantes de PvDBP. Esse *boosting* também foi observado por Souza-Silva et al. (2010) na comunidade agrícola do Acre e Cerávolo et al. (2009), acompanhando indivíduos infectados que previamente participaram de surto de malária em uma região não endêmica em Minas Gerais. Nesse último estudo citado, depois do surto, apenas 20% dos indivíduos possuíam anticorpos contra PvDBP, até que um segundo episódio de malária vivax ocorreu para alguns, ocasionando aumento no número de respondedores para essa proteína em 80%, porém diminuindo drasticamente dentro 6 meses. Os níveis de anticorpos anti-PvMSP-1<sub>19</sub> dessas pessoas se mantiveram constantes entre aqueles que sofreram infecção por malária após o surto primário ou não, ao contrário do que foi encontrado por nós no Remansinho. O aumento nos níveis de anticorpos anti-PvMSP-1<sub>19</sub> após exposição recente à malária também foi observado por Soares et al. (1999), Kano et al. (2012) e Barbedo et al. (2007).

Nenhuma associação entre parasitemia e níveis de anticorpos foi encontrada no Remansinho. Já entre os indivíduos analisados por Souza-Silva et al. (2010) a prevalência desses anticorpos aumentou linearmente com as parasitemias. Cole-Tobian et al. (2009)

também não encontrou associação entre anticorpos anti-PvDBP e parasitemia, obtida através de microscopia. Porém, quando a quantificação foi realizada através de métodos moleculares, houve uma tendência de diminuição de parasitemias com aumento nos níveis de anticorpos para uma única variante, a PvDBP O. Nenhuma associação entre anticorpos contra PvDBP e presença de sintomas para malária foi descrita no levantamento de Kano et al. (2012). No Remansinho, níveis similares de anticorpos anti-PvDBP estão entre sintomáticos e assintomáticos, sugerindo que não há associação entre níveis de anticorpos e sintomas entre infectados. Embora Cerávolo et al. (2008) tenha encontrado uma tendência de aumento nos níveis de anticorpos anti-PvDBP entre indivíduos assintomáticos, essa associação não foi significativa.

Altos níveis de anticorpos contra todas as variantes de PvDBP testadas, assim como outros antígenos, não revelaram proteção para malária causada por *P. vivax* nos indivíduos do Remansinho. No estudo de seguimento realizado por King et al. (2008) com crianças de Papua Nova Guiné que estavam infectadas no *baseline*, os respondedores para PvDBP foram divididos em tercis de acordo com reatividade determinada por ELISA e nenhuma diferença no tempo médio para re-infecção entre esses indivíduos foi encontrada. Um ano mais tarde, utilizando essas mesmas amostras, Cole-Tobian et al. (2009) afirmaram que altos níveis de anticorpos variante-específicos não afetaram a susceptibilidade para infecção causada por qualquer variante de *P. vivax*. Entretanto, níveis aumentados de anticorpos anti-PvDBP O e P, diminuíram significativamente o risco de infecção causada por qualquer cepa de *P. vivax* com parasitemia maior que 150 parasitas/ $\mu$ L, em 21% a 25%. De maneira geral, as crianças desse estudo demonstraram uma tendência de atraso na re-infecção por parasitas que expressam o mesmo haplótipo de PvDBPII (com diagnóstico por microscopia), comparado com infecções causadas por parasitas heterólogos. Crianças com altos níveis de anticorpos para mais de uma variante tiveram risco reduzido em 30% para infecções causadas por *P. vivax*, com parasitemias superiores a 150 parasitas/ $\mu$ L.

Também não encontramos nenhuma associação entre níveis de anticorpos, genótipo DARC e proteção. Ou seja, níveis de resposta contra as variantes de PvDBP incluídas no estudo não foram associados a nenhum antígeno DARC específico e conseqüentemente, proteção contra malária causada por *P. vivax*. No estudo de Souza-Silva e colaboradores (2014), com indivíduos de assentamento rural do Amazonas, não foram identificadas diferenças no número de respondedores entre aqueles com duplo alelo DARC positivo ou heterozigotos, ou

seja, os polimorfismos em Duffy não influenciaram nas respostas de anticorpos contra PvDBP. King et al. (2011), com amostras do Acre, também não observaram associação no percentual de indivíduos com respostas de anticorpos contra PvDBP e genótipo DARC. Apenas Maestre et al. (2010), em um estudo na Colômbia mostrou que a frequência e magnitude de resposta de anticorpos anti-PvDBP foi maior em indivíduos possuindo um único alelo Fy- (FY\*A ou FY\*B/FYB<sup>ES</sup>) do que em duplo positivos. Porém, esse trabalho contou apenas com 17 amostras positivas para anticorpos anti-PvDBP, sendo um número amostral muito pequeno para conclusões a respeito de uma associação entre anticorpos anti-PvDBP e alelos DARC positivos.

### **5.5 Resposta de anticorpos contra antígenos PvMSPs e EBA-175**

No presente estudo, a região N-terminal de PvMSP-9 mostrou-se pouco imunogênica com presença de 38,2% de respondedores, enquanto que 49% dos indivíduos avaliados por Lima-Junior et al. (2008) em Rondônia foram capazes de responder a essa porção da proteína. Embora no Remansinho anticorpos anti-PvMSP-9 tenham se correlacionado positivamente com a idade ( $P < 0,05$ ), para os moradores de Ribeirinha (Rondônia) respostas contra essa porção da proteína não foram associadas com idade, anos de residência em região amazônica ou número de infecções nos últimos 6 meses (LIMA-JUNIOR et al., 2008). Em Papua Nova Guiné, 45,9% das crianças 1 a 3 anos do estudo de Stanisc et al. (2013) responderam a essa porção da proteína e a presença desses anticorpos específicos foram mais comuns em crianças com infecção patente.

O número de indivíduos que soroconverteram para o bloco II da proteína PvMSP-3 $\alpha$  nesse trabalho (50,8%) foi muito semelhante ao descrito por Lima-Junior et al. (2011) com 282 indivíduos do estado de Rondônia (53%) e em crianças de 1 a 3 anos de idade em Papua Nova Guiné (38,3%). Nessas crianças, a partir dos 21 meses, a probabilidade de possuírem anticorpos contra essa proteína aumentou; entretanto, no Remansinho, essa foi a única proteína a não se correlacionar significativamente com a idade ( $P > 0,05$ ). Por fim, ainda no estudo de Stanisc et al. (2013), a presença de altos níveis de anticorpos para a região N-terminal de PvMSP-9 e o bloco II PvMSP-3 $\alpha$  foram associados com proteção à malária causada por *P. vivax*, fato não observado entre os indivíduos do Remansinho.

Os níveis de anticorpos encontrados para PvMSP-1<sub>19</sub> (67,5%), foram semelhantes aos de outros estudos em região amazônica: Bastos et al. (2007), com 54,13% de respondedores

no Acre, Kano et al. (2012), com 60% no Amazonas e níveis mais baixos foram encontrados por Soares et al. (1999) em indivíduos de Belém (43,2%). Nos estudos de Kano et al. (2012) e Soares et al. (1999), anticorpos para PvMSP-1<sub>19</sub> não foram correlacionados com a idade. Já no Remansinho, essa correlação foi fraca, porém positiva ( $P < 0,05$ ). Nenhuma associação entre repostas de anticorpos anti-PvMSP-1<sub>19</sub> e redução no risco de infecção por *P. vivax* foi encontrada no nosso estudo e em trabalhos de seguimento do Brasil e Papua Nova Guiné (COLE-TOBIAN et al., 2009; CUTTS et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2006).

Nenhum caso de malária causada por *P. falciparum* foi registrado no Remansinho a partir de março-abril/2011, porém, durante todo o período do estudo, 32,6% dos indivíduos foram capazes de responder contra PfEBA-175. Foi possível observar uma queda no número de respondedores de acordo com o tempo (Tabela A1, Anexos), provavelmente ocasionado pela falta de infecção causada por essa espécie.

Em um estudo realizado em Rondônia, com indivíduos sintomáticos e assintomáticos para malária causada por *P. falciparum*, 70% dos assintomáticos apresentaram anticorpos contra PfEBA-175 (MEDEIROS et al., 2013). Não é descartada a hipótese de que esses indivíduos possuem anticorpos anti-PfEBA-175 porque foram expostos à *P. falciparum* em um passado recente, porém também pode indicar a ocorrência de uma reação cruzada com PvDBP, lembrando que essas duas proteínas pertencem à mesma família das DBP-EBL, possuindo semelhança estrutural de aminoácidos nas regiões ricas em cisteína 5' e 3'.

## 5.6 Anticorpos inibitórios anti-PvDBP

Altos níveis de anticorpos contra PvDBP no Remansinho foram correlacionados com atividade inibitória, assim como nos estudos de King et al.(2008), Cerávolo et al. (2008) e Chootong et al. (2010). Porém, apenas 27,8% desses altos respondedores foram capazes de gerar anticorpos inibitórios capazes de bloquear a ligação entre PvDBP e DARC. Em estudos envolvendo anticorpos naturalmente adquiridos contra essa proteína, o número de indivíduos com anticorpos inibitórios variou de 8,7% nas crianças de área altamente endêmica acompanhadas por King et al. (2008) a 32% no estudo do assentamento rural no Acre por Souza-Silva et al. (2010) a Chootong et al. (2010), analisando 38 amostras provenientes de Papua Nova Guiné, revelaram que apenas 3 entre 10 indivíduos com altos títulos de anticorpos anti-PvDBP e um considerado baixo respondedor, foram capazes de inibir total ou quase

totalmente a ligação entre PvDBP e DARC. No Remansinho, esses anticorpos inibitórios correlacionaram-se fracamente, mas de maneira positiva, com a idade dos indivíduos; o mesmo foi observado em Papua Nova Guiné, porém sem significância estatística (KING et al., 2008).

Uma vez adquiridos, esses anticorpos inibitórios tendem a se manter estáveis ao longo do tempo, mesmo em uma região com queda nos níveis de transmissão de malária, como no Remansinho. King et al. (2008) observou tendência semelhante, mas apenas para anticorpos inibitórios contra a variante PvDBP AH, a mais frequente nesse estudo de Papua Nova Guiné. Chootong et al. (2010) também utilizando amostras de Papua Nova Guiné, observaram que nenhum dos indivíduos com anticorpos anti-PvDBP altamente inibitórios mudaram sua classificação dentro de um ano. Já no estudo de Souza-Silva et al. (2010), 14 dos 16 indivíduos com anticorpos inibitórios no *baseline* mantiveram suas respostas inibitórias contra pelo menos uma das variantes testadas (Sal I e Acre I) durante um ano. O oposto ocorreu com infectados após um surto em área não endêmica, na cidade de Souza (MG), onde os indivíduos perderam sua capacidade inibitória dentro de 6 meses após o registro do surto (CERÁVOLO et al., 2009).

Para reduzir a exposição de PvDBP ao sistema imune do hospedeiro, o ligante do parasita é apenas liberado dos micronemas e expresso na superfície do merozoíto momentos antes ao parasita iniciar a invasão ao eritrócito (ADAMS et al., 1990; WERTHEIMER et al., 1989). Esse mecanismo de evasão do sistema imune pode ser uma das causas para a baixa aquisição de anticorpos efetivamente inibitórios. Outra possível explicação pode ser devido a variabilidade do antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II, do hospedeiro. Kano et al. (2016) avaliando o baixo índice de respondedores inibitórios encontrados no mesmo assentamento rural do estudo de Kano et al. (2014) e Sousa-Silva et al. (2014), resolveram investigar se esse fato poderia estar associado a variabilidade no complexo principal de histocompatibilidade. Para tanto, foram genotipados os alelos *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* e *HLA-DQA1* entre respondedores ou não, e daqueles que desenvolveram anticorpos inibitórios durante o seguimento. Os autores encontraram 3 mutações associadas à presença de anticorpos inibitórios no *baseline* e à persistência dessas respostas inibitórias durante 1 ano de estudo, também foram associadas a esses 3 alelos HLA de classe II.

#### 5.6.1 Anticorpos inibitórios cepa-transcendentes

Estudos realizados por VanBuskirk et al. (2004b) apontaram que os aminoácidos 386, 417, 437 e 503 são epítomos dominantes e que polimorfismos nos códons que os geram, ocorrendo sozinhos ou em combinação, podem alterar o caráter antigênico de PvDBP, a ponto de comprometer a eficácia dos anticorpos inibitórios. Os autores chegaram a essa conclusão após ensaios de inibição utilizando anticorpos anti-PvDBP Sal I de coelho e células COS7 expressando a variante PNG 7.18 e observaram uma perda significativa na eficácia da inibição quando essa variante foi testada. Entre 85,4% e 89% das amostras que possuem anticorpos com alta atividade de inibição de ligação do Remansinho foram capazes de inibir a ligação entre cepas heterólogas de PvDBP (PvDBP C e P) e DARC. Essas variantes inclusive, possuem os polimorfismos mencionados, ou seja, nas amostras do Remansinho, essas mutações não interferiram na capacidade inibitória desses anticorpos.

Chootong et al. (2012) por sua vez, utilizando amostras da Tailândia (área de baixa e instável transmissão para malária), demonstraram um perfil diferente de anticorpos inibitórios dos descritos por nós neste trabalho. Primeiro que, entre 54 pacientes com malária vivax, os níveis de respostas anti- PvDBP não foram correlacionados com altos níveis de anticorpos inibitórios. Ainda, de acordo com os autores, certas mutações na interface do dímero de PvDBP (R308S, D384K), separadas ou ocorrendo ao mesmo tempo (D384K e K386N), podem alterar a eficácia de anticorpos neutralizantes adquiridos anti-PvDBP. A mutação R308S ocorre nas variantes utilizadas (PvDBP C e P) por nós nos ensaios de inibição de ligação cepa-transcendentes e entre aqueles com altos níveis de anticorpos inibitórios, essa mutação não foi capaz de alterar a capacidade antigênica dos anticorpos anti-PvDBP de indivíduos do Remansinho. Vale ressaltar que BR1 e BR2 (haplótipos mais frequentes na região estudada) não possuem mutações nos sítios mencionados, ou seja, os indivíduos do Remansinho aparentemente não tiveram obstáculos em reconhecer variantes com polimorfismos na região 308.

Anticorpos inibitórios cepa-transcendentes na Amazônia foram descritos no estudo de Souza-Silva et al. (2010), que testou amostras de plasma de 50 indivíduos e 16 deles apresentaram inibição > 50%, sendo que 13 deles apresentaram anticorpos inibitórios contra ambas proteínas testadas (Sal I e Acre I). Outro estudo conduzido por Cerávolo et al. (2008), revelou que indivíduos com longo tempo de exposição à malária em duas diferentes áreas da região amazônica foram capazes de adquirir anticorpos inibitórios para vários haplótipos de

PvDBP, ao contrário daqueles que esporadicamente foram expostos ao parasita, sugerindo que respostas inibitórias eficientes necessitam de longo tempo de exposição à malária.

Anticorpos inibitórios cepa-transcendentes também foram encontrados por King et al. (2008). Das 18 crianças com altos níveis de anticorpos inibitórios, 12 foram capazes de inibir 6 variantes (sendo 3 frequentes na região e 3 incomuns) acima de 90% e todos inibiram todas as variantes acima de 70%. Nesse estudo, das 40 crianças com níveis intermediários de atividade de inibição de ligação (50 - 89%), 14 apresentaram atividade inibitória cepa-transcendente, enquanto que três crianças com altos níveis de anticorpos mostraram evidências para inibição cepa-específica. Anticorpos variante-transcendentes também foram descritos no Irã por Valizadeh et al. (2016) e na Tailândia por Wongkidakarn et al. (2016) e todos obedecem ao mesmo padrão, uma pequena parcela dos inibitórios são variante-específicos, como também observado nas amostras do Remansinho, sugerindo que alguns possuem inibição por reconhecimento de resíduos polimórficos próximos. No estudo da Tailândia, apenas os indivíduos infectados com Sal I produziram anticorpos amplamente neutralizantes para cepas homólogas e heterólogas (circulantes na Tailândia), enquanto que aqueles infectados com cepas da Tailândia raramente produziram anticorpos neutralizantes para Sal I, ficando restritos a imunidade variante-transcendente apenas entre cepas frequentes daquela região (WONGKIDAKARN et. al, 2016).

Ao avaliar a presença de anticorpos altamente inibitórios cepa-transcendentes no estudo de King et al. (2008), Ntumngia e Adams (2012) sugeriram a hipótese de que epítomos polimórficos da região II de PvDBP podem representar um mecanismo de evasão que direciona a resposta imune para longe de epítomos menos imunogênicos e mais conservados, que podem ser potenciais alvos para imunidade cepa-transcendente. Para testar essa hipótese, os autores criaram uma proteína denominada "DEKnull", já que o epítomo com mais resíduos variáveis da região II de PvDBP foi chamado de "DEK" (sequência de aminoácidos presentes na variante Sal I) (CHOOTONG et al., 2010). A proteína DEKnull teve 9 dos 10 aminoácidos polares carregados da variante Sal I substituídos por um conjunto de resíduos variantes mutados para aminoácidos polares não carregados ou hidrofóbicos (troca de DEKAQRRKQ para ASTAATSRTS). Em ensaios de ligação *in vitro* essa proteína foi capaz de ligar-se em eritrócitos Duffy positivos com nenhuma diferença significativa em relação a Sal I. Testes com plasmas de Papua Nova Guiné mostraram que essa proteína é fortemente reconhecida, assim como Sal I. Ensaios de inibição de ligação em eritrócitos revelaram que

anticorpos anti-DEKnull são inibitórios, porém a uma titulação final menor que anticorpos anti-Sal I (1: 3.500 e 1: 5.000, respectivamente) confirmando que o epítopo DEK compreende um alvo que tem significância para anticorpos inibitórios, porém indicando que o antígeno sintético DEKnull contém epítopos conservados associados com inibição, apesar da falta de um epítopo dominante (NTUMNGIA; ADAMS, 2012).

Como nossos achados sugerem o reconhecimento de epítopos conservados por esses anticorpos altamente inibitórios cepa-transcendentes, nós expressamos em laboratório um anticorpo monoclonal anti-PvDBPII de um indivíduo do Remansinho com registros de alta e longa duração de atividade inibitória, durante o período do estudo. Esse anticorpo monoclonal nos permitiu entender um pouco sobre a especificidade desses anticorpos inibitórios, e a caracterização do mesmo será discutida a partir do item 5.7.

#### 5.6.2 Presença de anticorpos inibitórios e proteção para infecção por *Plasmodium vivax*

O estudo do Remansinho forneceu a evidência de que respostas com anticorpos inibitórios naturalmente adquiridos são associados com redução no risco de malária vivax clínica. De relevância, vale ressaltar que essas altas respostas inibitórias cepa-transcendentes foram desenvolvidas sob condições de baixa endemicidade, típicas de comunidades rurais amazônicas.

King et al. (2008), com amostras área altamente endêmica, encontraram significante atraso no tempo para infecção causada por *P. vivax* quando determinada via microscopia, entre indivíduos com altos níveis de anticorpos inibitórios comparados com baixos. Quando essa infecção foi determinada por métodos moleculares, nenhum atraso no tempo para episódio por *P. vivax* foi significativo. Nesse estudo, crianças com altas respostas inibitórias tiveram 55% de redução no risco de infecção por *P. vivax* ( $P = 0,04$ ), em relação aos que possuíam baixas atividades inibitórias. Crianças com níveis intermediários de respostas inibitórias apresentaram 25% de redução de risco de malária diagnosticada por microscopia, embora os efeitos desses anticorpos não foram estatisticamente significativos ( $P > 0,05$ ). No Remansinho, o modelo de hazards proporcionais de Cox, ajustado para idade, sexo e genótipo DARC, revelou uma redução de 41-42% no risco de malária vivax clínica entre indivíduos com respostas inibitórias nos tercis superior ( $\geq 50\%$  de atividade inibitória) e médio (6% - 49%), em relação àqueles do tercil inferior ( $< 6\%$  inibição).

O modelo de Cox não revelou interação significativa entre genótipo DARC e níveis de anticorpos com atividade de inibição de ligação, ou seja, o efeito protetor de anticorpos inibitórios não foram modulados pelo genótipo DARC do hospedeiro. Esse achado contradiz um dos resultados obtidos por Souza-Silva et al. (2014) em que indivíduos homocigotos para FY\*A ou FY\*B foram associados com baixa presença de anticorpos inibitórios. Ainda de acordo com os autores, a existência desses alelos junto com a mutação GATA (FY\*AFY\*<sup>B<sup>ES</sup></sup> e FY\*BFY\*<sup>B<sup>ES</sup></sup>) foram associados com respostas inibitórias mais altas, com perfil consistente nos três cortes realizados no estudo. Os autores concluíram que baseado nesses dados, genótipo DARC influencia a frequência e estabilidade da resposta inibitória humana à PvDBP, o que não foi observado nos indivíduos do Remansinho.

### **5.7 Anticorpo monoclonal anti-PvDBP II Sal I**

Como identificado por nós e previamente por outros autores em diferentes regiões endêmicas (de baixa ou alta transmissão), existem indivíduos que desenvolvem altos títulos de anticorpos inibitórios que efetivamente bloqueiam a interação entre DARC-PvDBP. Além da maioria serem inibitórios cepa-transcendentes, esses anticorpos não perdem sua capacidade de inibição ao longo do tempo. Na tentativa de caracterizar esses anticorpos e posteriormente identificar possíveis sítios de ligação na região II de PvDBP, nós expressamos em laboratório vinte e dois anticorpos monoclonais provenientes de dois indivíduos que atendiam ao perfil de respondedores inibitórios acima. Desses vinte e dois anticorpos expressos, apenas um foi capaz de reconhecer a variante PvDBP Sal I, através de ELISA. A partir de então começamos a caracterização do primeiro mAb brasileiro anti-PvDBP II, nomeado de 134/135.

Em primeiro, notamos uma tendência do mAb 134/135 em melhor inibir a interação entre PvDBP e hemácias do genótipo FY\*AFY\*A em relação a FY\*BFY\*B. Experimento semelhante foi descrito por King e colaboradores (2011), onde anticorpos anti-PvDBP II do plasma de doadores humanos (naturalmente adquiridos) e coelhos, foram purificados por afinidade e revelaram que ambos (tanto natural como artificial) inibem melhor a ligação entre PvDBP II e hemácias FY\*AFY\*A comparadas com FY\*BFY\*B. Nos nossos experimentos, o anticorpo monoclonal brasileiro 134/135 foi capaz de inibir 100% a ligação entre PvDBP Sal I e FY\*AFY\*A em duas diferentes concentrações (16 µg/mL e 4 µg/mL), enquanto que a inibição

foi menor em relação a eritrócitos expressando FY\*BFY\*B (93% na concentração de 16 µg/mL de mAb e 85%, na segunda concentração). De alguma maneira, parece existir uma maior afinidade entre a forma ancestral DARC FY\*BFY\*B e PvDBPII, com a qual anticorpos anti-PvDBP tem mais dificuldade em impedir a ligação. Vale lembrar que, nesse trabalho, King et al. (2011) observaram que alguns resultados *in vitro* foram consistentes com os achados *in vivo*, relacionando uma diminuição na susceptibilidade à malária causada por *P. vivax* relacionada a presença do alelo FY\*A, e um aumento na susceptibilidade com maior da expressão de FY\*B, dado que não foi observado no Remansinho.

Nosso próximo questionamento foi se os anticorpos altamente inibitórios reconheciam o mesmo epítipo ou similar dentro região II de PvDBP que o anticorpo monoclonal expresso. Para tanto, 170 amostras de plasma com altos níveis de anticorpos inibitórios foram testadas para competição por sítio de ligação em PvDBPII com o anticorpo monoclonal 134/135. Mais de 70% dessas amostras na diluição de 1:50 competiram ( $\geq 80\%$  de competição) pelo mesmo epítipo-alvo (ou similar) em PvDBP que o anticorpo monoclonal 134/135. Quando avaliamos se anticorpos monoclonais anti-PvDBPII expressos a partir de indivíduos do Camboja também competem pelos mesmos sítios de ligação com anticorpo brasileiro e plasma, notamos uma forte correlação na capacidade de competição dos plasmas por sítio de ligação entre o anticorpo monoclonal brasileiro e os do Camboja (nomeados como 92/96 e 99/100), com coeficiente de Spearman variando entre 0,807 e 0,844 ( $P < 0,0001$ ). Esses dados sugerem que na maioria das amostras de plasma testadas ocorre competição pelo mesmo sítio de ligação entre os três anticorpos monoclonais anti-PvDBP testados e as amostras de plasma de indivíduos do Remansinho, sugerindo que esses anticorpos reconheçam epítipos que são globalmente conservados.

Essas observações são semelhantes às encontradas para proteínas de superfície virais altamente polimórficas, como cepas de HIV-1. Zhou et al. (2015) caracterizaram um painel de 16 anticorpos anti-CD4bs (sendo 8 identificados nesse estudo) a partir de 14 doadores. Esses anticorpos que reconhecem CD4bs (CD4 *binding site*) podem bloquear a ligação da glicoproteína gp120 na molécula CD4 dos linfócitos. Essa região de ligação (CD4bs) é relativamente bem conservada e imunogênica na infecção por HIV-1 e os anticorpos monoclonais identificados no trabalho de Zhou e colaboradores (2015) foram capazes de neutralizar entre 82% a 58% de isolados de HIV-1 circulantes.

Ekier e Wilson (2012) revisaram vários anticorpos monoclonais que têm como alvo domínios conservados na glicoproteína de superfície do vírus Influenza, a hemaglutinina (HA). Essa proteína desempenha um papel importante na entrada do vírus através de ligação ao receptor nos hospedeiros e pela fusão da partícula viral endocitada com a membrana endossomal, permitindo o acesso do vírus ao citoplasma da célula do hospedeiro. Durante a replicação viral, essa proteína sofre um processo de clivagem em duas subunidades: HA1 e HA2. HA1 se localiza externamente ao envelope viral, sendo uma região altamente variável e onde se encontra o sítio de ligação ao receptor, o RBS (*receptor binding site*). Essa região, por sua vez, é funcionalmente conservada e alvo de anticorpos neutralizantes, que inibem a entrada do vírus por prevenir a ligação entre HA e o receptor do hospedeiro (revisto por WU; WILSON, 2017).

A porção da haste de HA é composta principalmente por HA2, com alguns resíduos N e C-terminais de HA1. Essa região possui menos variação de sequências entre as cepas e subtipos virais quando comparado a RBS, sendo o local que contém os epítomos mais conservados para o reconhecimento de anticorpos na HA. Anticorpos contra essa região afetam as mudanças conformacionais das hemaglutininas necessárias para a fusão da membrana viral e do endossoma. A maioria dos anticorpos contra essa porção são mais específicos do grupo 1 de viroses, como mAbs CR621 e F10, que reconhecem o mesmo e conservado epítomo nessa região. O monoclonal CR8020 identificado por *phage display* é capaz de se ligar em vírus do grupo 2 e também reconhece um epítomo localizado na haste da hemaglutinina. Ainda, existem aqueles anticorpos capazes de se ligar em ambos os grupos de Influenza (atualmente são 18 subtipos de HA, divididos em 2 grupos: grupo 1 e grupo 2), como os mAbs CR9114 e FI6v3 (EKIER e WILSON, 2012; revisto por WU; WILSON, 2017), também na região da haste.

Embora o epítomo que o mAb 134/135 reconhece em PvDBP ainda precisa ser identificado, é possível que pertença ao subdomínio 2 (SD2) da região II de PvDBP, onde se encontram os resíduos iniciais necessários para a ligação entre PvDBPII-DARC e dimerização de PvDBP (BATCHELOR et al., 2011; 2014). Dados não publicados, indicam que os anticorpos monoclonais anti-PvDBPII do Camboja (92/96 e 99/100), utilizados nessa tese nos ensaios de competição, reconhecem epítomos dentro do subdomínio 2 da proteína. Esses mAbs são capazes de competir pelo mesmo sítio de ligação com as amostras de plasmas com altos níveis de anticorpos inibitórios e com o monoclonal brasileiro 134/135.

A cristalização da interação de PvDBP-DARC identificou no subdomínio 2 da região II de PvDBP, resíduos que fazem contato direto com a porção N-terminal de DARC (L270-K389, Q356-K367 e F261-266). Mutações nesses resíduos como em Y363 ou A281, envolvidos na interface da primeira ligação à DARC acarretam em completa inibição de ligação ao receptor. Já mutações nos resíduos D264, I265 e T266, localizados na interface de ligação secundária à DARC, resultam em perda na ligação ao eritrócito, pois comprometem a formação do heterotetrâmero, indispensável no processo de invasão (BATCHELOR et al., 2014; HANS et al., 2005; VANBUSKIRK et al., 2004a), indicando a importância desses epítopos se manterem conservados. Já a porção hipervariável “DEK”, primeiramente descrita por Chootong e colaboradores (2010), é vista flanqueando as regiões de ligação e a interface do dímero da proteína. Esse epítipo polimórfico não possui papel direto na ligação a DARC, não afeta a função da proteína, sendo também conhecido como epítipo “chamariz”, que desvia a resposta imune de epítopos mais conservados, capazes de causar ampla neutralização (BATCHELOR et al., 2014). O fato do anticorpo monoclonal brasileiro competir pelo mesmo sítio de ligação com anticorpos inibitórios e os mAbs do Camboja (que reconhecem o subdomínio 2) sugere que a estrutura e padrão de resposta para PvDBPII possui similaridades com os mencionados vírus Influenza e HIV-1, onde resíduos altamente polimórficos e imunogênicos ficam ao lado de regiões funcionalmente conservadas e críticas para o reconhecimento do receptor nas células hospedeiras.

Chen e colaboradores (2016) através de cristalografia, mapearam os epítopos de reconhecimento de 3 anticorpos monoclonais anti-PvDBP inibitórios murinos (2D10, CC6 e 2H2) e um não-inibitório (3D10) descritos por Ntumngia et al. (2012b). Os autores identificaram que os epítopos reconhecidos pertencem a região do SD3 (subdomínio 3) de PvDBP, enquanto que o epítipo não-inibitório, a SD1. Dados não publicados revelam que os anticorpos inibitórios murinos 2D10 e 2H2 possuem capacidade de bloqueio substancialmente mais baixa quando comparada com anticorpo monoclonal humano anti-PvDBP. De acordo com Batchelor et al. (2014), embora anticorpos contra o SD2 sejam neutralizadores mais potentes, o subdomínio 3 encontra-se próximo da porção de PvDBP que se aproxima da hemácia. Sendo assim, anticorpos contra essa região podem bloquear a ligação impedindo que região II de PvDBP se aproxime da superfície da hemácia e faça contato com DARC (BATCHELOR et al., 2014).

Até agora, poucos anticorpos monoclonais humanos contra malária foram expressos e a maior parte deles são exclusivamente para moléculas de *P. falciparum*, como para PfAMA-1 (MASKUS et al., 2015) através da técnica de EBV, PfMSP-10 (MASKUS et al., 2016), também através de EBV e antígeno GMZ2, um candidato a vacina para essa espécie por Muellenbeck et al. (2013), utilizando a mesma técnica descrita nesta tese. Outros trabalhos utilizaram *phage-display* de fragmento de cadeia única, conhecido como scFv (*single-chain fragments of variable fragment*) (CHENG et al., 2007; LUNDQUIST et al., 2006). Para *P. vivax*, anticorpos monoclonais humanos foram produzidos por Kim et al. (2007) utilizando essa estratégia de scFv. Através dessa abordagem, os autores geraram três fragmentos de anticorpos scFvs a partir de três pacientes coreanos infectados *P. vivax*. Esses três fragmentos de anticorpos foram testados em ensaios de inibição de ligação em células COS expressando PvDBPII e parcialmente bloquearam a ligação entre PvDBPII e hemácias do tipo O. Porém, os epítomos que fragmentos scFvs reconhecem em PvDBPII não foram mapeados e também não foi determinado se são capazes de reconhecer outras variantes de PvDBP (se são cepa-transcendentes).

Com objetivo de avaliar se o anticorpo monoclonal anti-PvDBP brasileiro era capaz de inibir a entrada do parasita em reticulócitos, foram realizados ensaios de inibição de invasão. Para tanto, foram utilizadas hemácias infectadas criopreservadas de indivíduos de região endêmica amazônica e a metodologia foi baseada conforme Shaw Saliba et al. (2016). Vale ressaltar que ainda existe muita dificuldade na manutenção a longo prazo da cultura de *P. vivax*. Durante nossos experimentos, observamos que os parasitas sobreviveram no máximo a dois ou três ciclos de re-invasões, tornando-se assíncronicos geralmente após o primeiro ciclo, com alguns apresentando morfologia irregular, atraso no desenvolvimento para estágios subsequentes e queda acentuada na parasitemia.

Grimberg et al.(2007) utilizaram anticorpos IgG anti-PvDBP de coelhos imunizados (obtidos por Protein G column) e um *pool* de plasmas de humanos expostos a *P. vivax* em Papua Nova Guiné (purificados após passagem em coluna de afinidade com 5 mg de PvDBPII) em ensaios de inibição de invasão. Em ambos os experimentos, anticorpos anti-PvDBP de seres humanos e coelhos demonstraram inibição dose-dependente. Para anticorpos purificados contra PvDBP de seres humanos, a maior inibição (54%) foi alcançada quando a concentração de anti-PvDBP foi de 150 µg/mL. O monoclonal 134/135 também parcialmente inibiu a invasão de merozoítos de maneira dose-dependente. Na concentração de 100 µg/mL

esse anticorpo foi capaz de inibir 69% de invasões de merozoítos em reticulócitos. Já o anticorpo monoclonal do Camboja 99/100, utilizado como controle na concentração de 50 µg/mL, foi capaz de inibir 52% de novas invasões, em relação ao controle sem adição de anticorpos.

Ainda serão necessários mais ensaios com diferentes parasitas para que possamos melhor definir o perfil inibitório desse anticorpo monoclonal. Além disso, também serão realizados o sequenciamento da região II de PvDBP de cada parasita utilizado, para que se possa definir se esse anticorpo é capaz de inibir da mesma forma haplótipos diferentes. Ensaios de inibição de invasão com amostras não congeladas, imediatamente após a coleta em campo, também deverão ser realizados.

Anticorpos monoclonais tem sido utilizados no tratamento/proteção de crianças prematuras para vírus sincicial (VSR) (HUANG; WU, 2014), para o vírus Ebola (DAVIDSON et al., 2015) ou infecções por HIV (SCHOOFS et al., 2016). O tratamento de malária com anticorpos monoclonais não é prático ou efetivo, a menos que o indivíduo esteja infectado com múltiplos clones resistentes à drogas. Entretanto, estudos envolvendo anticorpos monoclonais contra *P. vivax* podem identificar potenciais alvos no parasita que conferem proteção, os níveis de anticorpos exigidos para tanto, assim como os melhores isotipos e subclasses. Tais dados podem fornecer estrutura para o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de elicitar respostas de anticorpos amplamente bloqueadoras.

## 6 CONCLUSÃO

Com os resultados deste trabalho podemos concluir que:

1. Variantes da região II de PvDBP de *Plasmodium vivax* são altamente imunogênicas em indivíduos de um assentamento rural na Amazônia brasileira.
2. Nenhuma variante utilizada como antígeno no estudo foi encontrada circulante na região.
3. Anticorpos anti-PvDBP foram capazes de reconhecer diferentes variantes, ou seja, cepa-transcendentes.
4. Altos níveis de anticorpos anti-PvDBP não protegem de episódio subsequente de malária vivax clínica.
5. Cerca de 27% dos indivíduos com altos níveis de anticorpos IgG anti-PvDBP são capazes de inibir a interação de DARC-PvDBP, acima de 80%.
6. A maior parte daqueles com anticorpos inibitórios foram capazes de inibir variantes heterológicas, ou seja, são inibitórios cepa-transcendentes.
7. Indivíduos pertencentes aos tercís superior e médio de anticorpos inibitórios mostraram uma redução de 41-42% do risco de malária clínica em relação aos indivíduos do tercil inferior.
8. Nenhum genótipo DARC específico foi associado com níveis de respostas de anticorpos anti-PvDBPII ou com a presença de anticorpos inibitórios e proteção de malária clínica.
9. O anticorpo monoclonal anti-PvDBPII expresso é capaz de competir pelo mesmo sítio de ligação em PvDBP (ou similar) com anticorpos naturalmente adquiridos e mAbs anti-PvDBPII do Camboja, provavelmente reconhecendo epítomos globalmente conservados.
10. O anticorpo monoclonal anti-PvDBPII é capaz de inibir parcialmente a invasão de merozoítos de *P. vivax* em reticulócitos, através de ensaios de inibição de invasão.

REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ADAMS, J. H.; HUDSON, D. E.; TORII, M.; WARD, G. E.; WELLEMS, T. E.; AIKAWA, M.; MILLER, L. H. The duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell**, v. 63, n. 1, p. 141-153, 1990.

ADAMS, J. H.; SIM, B. K.; DOOLAN, S. A.; FANG, X.; KASLOW, D. C.; MILLER, R. L. H. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **PNAS**, v. 89, n.15, p. 7085-7089, 1992.

ADAMS, J. H.; BLAIR, P. L.; KANEKO, O.; PETERSON, D. S. An expanding EBL family of *Plasmodium falciparum*. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 6, p. 297-299, 2001.

ALBUQUERQUE S. R. L.; CAVALCANTE, F. O.; SANGUINO E. C.; TEZZA, L.; CHACON, F.; CASTILHO, L.; SANTOS, M. C. FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 106, n. 5, p. 1049-1053, 2010.

ALIPRANDINI, E. **Obtenção de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos**. 2015. 119 f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ALVES, F.P.; DURLACHER, R. R.; MENEZES, M. J.; KRIEGER, H.; SILVA, L. H.; CAMARGO, E. P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n.6, p. 641-648, 2002.

AMPUDIA, E.; PATARROYO, M. A.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 78 n. 1-2, p. 269-272, 1996.

ARNDT, P. A.; HORN, T.; KELLER, J. A.; HERI, S. M.; KELLER, M. A. First example of an FY\*01 allele associated with weakened expression of Fya on red blood cells. **Immunohematology**, v.31, n. 3, p. 103-107, 2015.

BALDWIN, M. R.; LI, X.; HANADA, T.; LIU, S. C.; CHISHTI, A. H. Merozoite surface protein 1 recognition of host glycophorin A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. **Blood**, v. 125, n. 17, p. 2704-2711, 2015.

BANNISTER, L. H.; HOPKINS, J. M.; DLUZEWSKI, A. R.; MARGOS, G.; WILLIAMS, I. T.; BLACKMAN, M. J.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; MITCHELL, G. H. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. **J. Cell Sci.**, v. 116, n. 18, p. 3825-3834, 2003.

BARBEDO, M. B.; RICCI, R.; JIMENEZ, M. C.; CUNHA, M. G.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 335-339, 2007.

---

<sup>1</sup> De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARBOSA, S.; GOZZE, A. B.; LIMA, N. F.; BATISTA, C. L.; BASTOS, M. DA S.; NICOLETE, V. C.; FONTOURA, P. S.; GONÇALVES, R. M.; VIANA, S. A.; MENEZES, M. J.; SCOPEL, K. K.; CAVASINI, C. E.; MALAFRONTTE, R. DOS S.; DA SILVA-NUNES, M.; VINETZ, J. M.; CASTRO, M. C.; FERREIRA, M. U. Epidemiology of disappearing Plasmodium vivax malaria: a case study in rural Amazonia. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 8, p. e3109, 2014.

BARGIERI, D. Y.; ANDENMATTEN, N.; LAGAL, V.; THIBERGE, S.; WHITELAW, J. A.; TARDIEUX, I.; MEISSNER, M.; MÉNARD, R. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. **Nat. Commun.**, v. 4, n. 2552, 2013.

BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; DESIMONE, S. G.; PERLER, F.; INGRAVALLO, P. Plasmodium vivax, P. cynomolgi, and P. knowlesi: identification of homologue proteins associated with the surface of merozoites. **Exp. Parasitol.**, v. 91, n. 3, p. 238–249, 1999.

BASTOS, M. S.; DA SILVA-NUNES, M.; MALAFRONTTE, R. S.; HOFFMANN, E. H.; WUNDERLICH, G.; MORAES, S. L.; FERREIRA, M. U. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 10, p. 1249-1259, 2007.

BATCHELOR, J. D.; ZAHM, J. A.; TOLIA, N. H. Dimerization of Plasmodium vivax DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 18, n. 8, p. 908-914, 2011.

BATCHELOR, J. D.; MALPEDE, B. M.; OMATTAGE, N. S.; DEKOSTER, G. T.; HENZLER-WILDMAN, K. A.; TOLIA, N. H. Red blood cell invasion by Plasmodium vivax: structural basis for DBP engagement of DARC. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 1, p. e1003869, 2014.

BATISTA, C. L.; BARBOSA, S.; DA SILVA BASTOS, M.; VIANA, S. A.; FERREIRA, M. U. Genetic diversity of Plasmodium vivax over time and space: a community-based study in rural Amazonia. **Parasitology**, v. 142, n. 2, p. 374-384, 2015.

BEESON, J. G.; OSIER, F. H.; ENGWERDA, C. R. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 12, p. 578-584, 2008.

BESTEIRO, S.; MICHELIN, A.; PONCET, J.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Export of a Toxoplasma gondii rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 2, p. e1000309, 2009.

BITENCOURT, A. R.; VICENTIN, E. C.; JIMENEZ, M. C.; RICCI, R.; LEITE, J. A.; COSTA, F. T.; FERREIRA, L. C.; RUSSELL, B.; NOSTEN, F.; RÉNIA, L.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Antigenicity and immunogenicity of Plasmodium vivax merozoite surface protein-3. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56061, 2013.

BLACKMAN, M. J.; HEIDRICH, H. G.; DONACHIE, S.; MCBRIDE, J. S.; HOLDER, A. A. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 172, n. 1, p. 379-382, 1990.

BOYLE, M. J.; LANGER, C.; CHAN, J. A.; HODDER, A. N.; COPPEL, R. L.; ANDERS, R. F.; BEESON, J. G. Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 3, p. 924-936, 2014.

BOZDECH, Z.; MOK, S.; HU, G.; IMWONG, M.; JAIDEE, A.; RUSSELL, B.; GINSBURG, H.; NOSTEN, F.; DAY, N. P.; WHITE, N. J.; CARLTON, J. M.; PREISER, P. R. The transcriptome of *Plasmodium vivax* reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. **PNAS**, v. 105, n. 42, p. 16290-1695, 2008.

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; MERINO, E. F.; AMEDEO, P.; CHENG, Q.; COULSON, R. M.; CRABB, B. S.; DEL PORTILLO, H. A.; ESSIEN, K.; FELDBLYUM, T. V.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; GILSON, P. R.; GUEYE, A. H.; GUO, X.; KANG'A, S.; KOIJ, T. W.; KORSINCZKY, M.; MEYER, E. V.; NENE, V.; PAULSEN, I.; WHITE, O.; RALPH, S. A.; REN, Q.; SARGEANT, T. J.; SALZBERG, S. L.; STOECKERT, C. J.; SULLIVAN, S. A.; YAMAMOTO, M. M.; HOFFMAN, S. L.; WORTMAN, J. R.; GARDNER, M. J.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; FRASER-LIGGETT, C. M. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 757-763, 2008.

CARVALHO, T. A.; QUEIROZ, M. G.; CARDOSO, G. L.; DINIZ, I. G.; SILVA, A. N.; PINTO, A. Y.; GUERREIRO, J. F. *Plasmodium vivax* infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. **Malar J.**, v. 11, n. 430, p. 1-6, 2012

CASTILHO, L.; RIOS, M.; PELLEGRINO, J. J. R.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F.; REID, M. E. A novel FY allele in Brazilians. **Vox Sang.**, v. 87, n. 3, p. 190-195, 2004.

CAVASINI, C. E.; PEREIRA, J. T.; RIBEIRO, W. L.; WUNDERLICH, G.; FERREIRA, M. U. Duffy group genotypes among malaria patients in Rondonia, Western Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 6, p. 591-594, 2001.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, L. A. R. D.; COUTO, V. S. C. A.; GOLLINO, Y.; MORETTI, L. J.; DOMINGOS, C. R. B.; ROSSIT, A. R. B.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. L. D. Duffy blood gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. **Malar. J.**, n. 6, v. 167, p. 1-8, 2007a.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, A. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; VALENCIA, S. H.; NEIRAS, W. C.; ALVES, R.T.; ROSSIT, A. R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. L. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, n.10, p. 1042-1044, 2007b.

Center for disease control and prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso 29 Jun 2017.

CERÁVOLO, I. P.; BRUÑA-ROMERO, O.; BRAGA, E. M.; FONTES, C. J.; BRITO, C. F.; SOUZA, J. M.; KRETTLI, A. U.; ADAMS, J. H.; CARVALHO, L. H. Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 6, p. 675-681, 2005.

CERÁVOLO, I. P.; SOUZA-SILVA, F. A.; FONTES, C. J.; BRAGA, E. M.; MADUREIRA, A. P.; KRETTLI, A. U.; SOUZA, J. M.; BRITO, C. F.; ADAMS, J. H.; CARVALHO, L. H. Inhibitory properties of the antibody response to Plasmodium vivax Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. **Scand. J. Immunol.**, v. 67, n. 3, p. 270-278, 2008.

CERÁVOLO, I. P.; SANCHEZ, B. A.; SOUSA, T. N.; GUERRA, B. M.; SOARES, I. S.; BRAGA, E. M.; MCHENRY, A. M.; ADAMS, J. H.; BRITO, C. F.; CARVALHO, L. H. Naturally acquired inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 156, n. 3, p. 502-510, 2009.

CHANDRAMOHANADAS, R.; BASAPPA, RUSSELL, B.; LIEW, K.; YAU, Y. H.; CHONG, A.; LIU, M.; GUNALAN, K.; RAMAN, R.; RENIA, L.; NOSTEN, F.; SHOCHAT, S. G.; DAO, M.; SASISEKHARAN, R.; SURESH, S.; PREISER, P. Small molecule targeting malaria merozoite surface protein-1 (MSP-1) prevents host invasion of divergent plasmodial species. **J. Infect. Dis.**, v. 210, n. 10, p. 1616-1626, 2014.

CHAUDHURI, A.; POLYKOVA, J.; ZBRZENA, V.; WILLIAMS, K.; GULATI, S.; POGO, A. O. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. **PNAS**, v. 90, n. 22, p. 10793-10797, 1993.

CHAUDHURI, A.; POYAKOVA, J.; ZBZESNA, V.; POGO, A. O. The coding sequence of Duffy blood group gene in human and Simians: Restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy negative individual. **Blood**, v. 85, n. 3, p. 615- 621, 1995.

CHEN, E.; SALINAS, N. D.; HUANG, Y.; NTUMNGIA, F.; PLASENCIA, M. D.; GROSS, M. L.; ADAMS, J. H.; TOLIA, N. H. Broadly neutralizing epitopes in the Plasmodium vivax vaccine candidate Duffy Binding Protein. **PNAS**, v. 113, n. 22, p. 6277-6282, 2016.

CHENG, X. J.; HAYASAKA, H.; WATANABE, K.; TAO, Y. L.; LIU, J. Y.; TSUKAMOTO, H.; HORII, T.; TANABE, K.; TACHIBANA, H. Production of high-affinity human monoclonal antibody fab fragments to the 19-kilodalton C-terminal merozoite surface protein 1 of Plasmodium falciparum. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 7, p. 3614-3620, 2007.

CHOE, H.; MOORE, M. J.; OWENS, C. M.; WRIGHT, P. L.; VASILIEVA, N.; LI, W.; SINGH, A. P.; SHAKRI, R.; CHITNIS, C. E.; FARZAN, M. Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and Plasmodium vivax Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 5, p. 1413-1422, 2005.

CHOOTONG, P.; NTUMNGIA, F. B.; VANBUSKIRK, K. M.; XAINLI, J.; COLE-TOBIAN, J. L.; CAMPBELL, C. O.; FRASER, T. S.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Mapping epitopes of the Plasmodium vivax Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 3, p. 1089-1095, 2010.

CHOOTONG, P.; PANICHAKUL, T.; PERMMONGKOL, C.; BARNES, S. J.; UDOMSANGPETCH, R.; ADAMS, J. H. Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: approach to Plasmodium vivax vaccine development in Thailand. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35769, 2012.  
COLE-TOBIAN, J. L.; CORTÉS, A.; BAISOR, M.; KASTENS, W.; XAINLI, J.; BOCKARIE, M.; ADAMS, J. H.; KING, C. L. Age-acquired immunity to a Plasmodium vivax invasion ligand, the duffy binding protein. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 4, p. 531-539, 2002.

COLE-TOBIAN, J.; KING, C. L. Diversity and natural selection in Plasmodium vivax Duffy binding protein gene. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 127, n. 2, p. 121-132, 2003.

COLE-TOBIAN, J. L.; MICHON, P.; BIASOR, M.; RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G.; MUELLER, I.; KING, C. L. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous plasmodium vivax strains in Papua New Guinean children. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 9, p. 4009-4017, 2009.

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S. B.; DIVIS, P. C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG, K. T.; ADEM, P.; ZAKI, S. R.; SINGH, B.; KRISHNA, S. Severe malaria - a case of fatal Plasmodium knowlesi infection with post-mortem findings: a case report. **Malar. J.**, v.9, n. 10, p. 1-7, 2010.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006.

CROSNIER, C.; BUSTAMANTE, L. Y.; BARTHOLDSON, S. J.; BEI, A. K.; THERON, M.; UCHIKAWA, M.; MBOUP, S.; NDIR, O.; KWIATKOWSKI, D. P.; DURAISINGH, M. T.; RAYNER, J. C.; WRIGHT, G. J. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 534-537, 2011.

CUNHA, M. G.; SILVA, E. S.; SEPÚLVEDA, N.; COSTA, S. P.; SABOIA, T. C.; GUERREIRO, J. F.; PÓVOA, M. M.; CORRAN, P. H.; RILEY, E.; DRAKELEY, C. J. Serologically defined variations in malaria endemicity in Pará state, Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113357, 2014.

CUTTS, J. C.; POWELL, R.; AGIUS, P. A.; BEESON, J. G.; SIMPSON, J. A.; FOWKES, F. J. Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. **BMC Med.**, v. 12, n. 150, p. 1-20, 2014.

DA SILVA-NUNES, M.; CODEÇO, C. T.; MALAFRONTA, R. S.; DA SILVA, N. S.; JUNCANSEN, C.; MUNIZ, P. T.; FERREIRA, M. U. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 4, p. 624-635, 2008.

DAVIDSON, E.; BRYAN, C.; FONG, R. H.; BARNES, T.; PFAFF, J. M.; MABILA, M.; RUCKER, J. B.; DORANZ, B. J. Mechanism of Binding to Ebola Virus Glycoprotein by the ZMapp, ZMAb, and MB-003 Cocktail Antibodies. **J. Virol.**, v. 89, n. 21, p. 10982-10992, 2015.

DEANS, J. A.; THOMAS, A. W.; ALDERSON, T.; COHEN, S. Biosynthesis of a putative protective Plasmodium knowlesi merozoite antigen. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 11, p. 189-204, 1984.

DE PINA-COSTA, A.; BRASIL, P.; DI SANTI, S. M.; DE ARAUJO, M. P.; SUÁREZ-MUTIS, M. C.; SANTELLI, A. C.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618-633, 2014.

DE NIZ, M.; BURDA, P. C.; KAISER, G.; DEL PORTILLO, H. A.; SPIELMANN, T.; FRISCHKNECHT, F.; HEUSSLER, V. T. Progress in imaging methods: insights gained into Plasmodium biology. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 37-54, 2017.

DLUZEWSKI, A. R.; LING, I. T.; HOPKINS, J. M.; GRAINGER, M.; MARGOS, G.; MITCHELL, G. H.; HOLDER, A. A.; BANNISTER, L. H. Formation of the food vacuole in Plasmodium falciparum: a potential role for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein 1 (MSP1(19)). **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3085, 2008.

DONAHUE, R. P.; BIAS, W. B.; RENWICK, J. H.; MCKUSICK, V. A. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. **PNAS**, v. 61, n. 3, p. 949-955, 1968.

DONAHUE, C. G.; CARRUTHERS, V. B.; GILK, S. D.; WARD, G. E. The Toxoplasma homolog of Plasmodium apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, n. 1, p. 15-30, 2000.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **MAbs**, v. 7, n.1, p. 9-14, 2015.

EKIERT, D. C.; WILSON, I. A. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. **Curr. Opin. Virol.**, v. 2, n. 2, p. 134-141, 2012.

ESCOLANO, A.; DOSENOVIC, P.; NUSSENZWEIG, M. C. Progress toward active or passive HIV-1 vaccination. **J. Exp. Med.**, v. 214, n. 1, p. 3-16, 2017.

FERREIRA, M. U. **Parasitologia Contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

FOLEGATTI, P. M.; SIQUEIRA, A. M.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V.; DRAKELEY, C. J.; BRAGA, É. M. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. **Malar J.**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2017.

FOWKES, F. J.; BOEUF, P.; BEESON, J. G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. **Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 139-153, 2016.

FRASER, T.; MICHON, P.; BARNWELL, J. W.; NOE, A. R.; AL-YAMAN, F.; KASLOW, D. C.; ADAMS, J. H. Expression and serologic activity of a soluble recombinant Plasmodium vivax Duffy binding protein. **Infect. Immun.**, v. 65, n.7, p. 2772-2777, 1997.

GAFFAR, F. R.; YATSUDA, A. P.; FRANSSSEN, F. F.; DE VRIES, E. Erythrocyte invasion by Babesia bovis merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 5, p. 2947-2955, 2004.

GALINSKI, M. R.; MEDINA, C. C.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. W. A reticulocyte-binding protein complex of Plasmodium vivax merozoites. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1213-1226, 1992.

GALINSKI, M. R.; CORREDOR-MEDINA, C.; POVOA, M.; CROSBY, J.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 101, n. 1-2, p. 131-147, 1999.

GALINSKI, M. R.; XU, M.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax reticulocyte binding protein-2 (PvRBP-2) shares structural features with PvRBP-1 and the Plasmodium yoelii 235 kDa rhoptry protein family. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 108, n. 2, p. 257-262, 2000.

GALINSKI, M. R.; INGRAVALLO, P.; CORREDOR-MEDINA, C.; AL-KHEDERY, B.; POVOA, M.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax merozoite surface proteins-3beta and-3gamma share structural similarities with P. vivax merozoite surface protein-3alpha and define a new gene family. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 115, n. 1, p. 41-53, 2001.

GAUR, D.; MAYER, D. C.; MILLER, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by Plasmodium merozoites. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 13-14, p. 1413-1429, 2004.

GILSON PR, CRABB BS. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum merozoites. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, n. 1, p. 91-96, 2009.

GOEL, V. K.; LI, X.; CHEN, H.; LIU, S. C.; CHISHTI, A. H.; OH, S. S. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. **PNAS**, v. 100, n. 9, p. 5164-5169, 2003.

GOLEND, C. F.; LI, J.; ROSENBERG, R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite Plasmodium vivax. **PNAS**, v. 94, n. 13, p. 6786-91, 1997.

GONÇALVES, R. M.; SCOPEL, K. K.; BASTOS, M. S.; FERREIRA, M. U. Cytokine balance in human malaria: does Plasmodium vivax elicit more inflammatory responses than Plasmodium falciparum? **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44394, 2012.

GOSI, P.; KHUSMITH, S.; KHALAMBAHETI, T.; LANAR, D. E.; SCHAECHER, K.E.; FUKUDA, M. M.; MILLER, S. R. Polymorphisms of Plasmodium vivax duffy binding protein in isolates from Thai patients. **Malar. J.**, v. 7, n. 112, 2008.

GRIMBERG, B. T.; UDOMSANGPETCH, R.; XAINLI, J.; MCHENRY, A.; PANICHAKUL, T.; SATTABONGKOT, J.; CUI, L.; BOCKARIE, M.; CHITNIS, C.; ADAMS, J.; ZIMMERMAN, P. A.; KING, C. L. Plasmodium vivax invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. **PLoS Med.**, v. 4, n. 12, p. e337, 2007.

GRUSZCZYK, J.; LIM, N. T.; ARNOTT, A.; HE, W. Q.; NGUITRAGOOL, W.; ROOBOOONG, W.; MOK, Y. F.; MURPHY, J. M.; SMITH, K. R.; LEE, S.; BAHLO, M.; MUELLER, I.; BARRY, A. E.; THAM, W. H. Structurally conserved erythrocyte-binding domain in Plasmodium provides a versatile scaffold for alternate receptor engagement. **PNAS**, v. 113, n. 2, p. e191-200, 2016.

GUPTA, E. D.; ANAND, G.; SINGH, H.; CHADDHA, K.; BHARTI, P. K.; SINGH, N.; SHARMA, Y. D.; GAUR, D. Naturally Acquired Human Antibodies Against Reticulocyte-Binding Domains of Plasmodium vivax Proteins, PvRBP2c and PvRBP1a, Exhibit Binding-Inhibitory Activity. **J. Infect. Dis.**, v. 215, n. 10, p. 1558-1568, 2017.

HACKETT, F.; SAJID, M.; WITHERS-MARTINEZ, C.; GRAINGER, M.; BLACKMAN, M. J. PfsUB-2: a second subtilisin-like protein in Plasmodium falciparum merozoites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 103, n. 2, p. 183-195, 1999.

HADLEY, T. J.; PEIPER, C. From malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v. 89, n. 9, p. 3077-3091, 1997.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HALPER-STROMBERG, A.; NUSSENZWEIG, M. C. Towards HIV-1 remission: potential roles for broadly neutralizing antibodies. **J. Clin. Invest.**, v. 126, n. 2, p. 415-423, 2016.

HAN, H. J.; PARK, S. G.; KIM, S. H.; HWANG, S. Y.; HAN, J.; TRACOFF, J.; KHO, W. G.; CHUNG, J. Y. Epidermal growth factor-like motifs 1 and 2 of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 are critical domains in erythrocyte invasion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 320, n. 2, p. 563-570, 2004.

HAN, J. H.; LEE, S. K.; WANG, B.; MUH, F.; NYUNT, M. H.; NA, S.; HA, K. S.; HONG, S. H.; PARK, W. S.; SATTABONGKOT, J.; TSUBOI, T.; HAN, E. T. Identification of a reticulocyte-specific binding domain of Plasmodium vivax reticulocyte-binding protein 1 that is homologous to the PfRh4 erythrocyte-binding domain. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 26993, p. 1-12, 2016.

HANS, D.; PATNAIK, P.; BHATTACHARYYA, A.; SHAKRI, A. R.; YAZDANI, A. S.; SHARMA, M.; CHOE, H.; FARZAN, M.; CHITNIS, C. E. Mapping binding residues in the Plasmodium vivax domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 5, p. 1423-1434, 2005.

HARRIS, P. K.; YEOH, S.; DLUZEWSKI, A. R.; O'DONNELL, R. A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BANNISTER, L. H.; MITCHELL, G. H.; BLACKMAN, M. J. Molecular Identification of a Malaria Merozoite Surface Sheddase. **PLoS Pathog.**, v. 1, n. 3, p. e29, 2005.

HARVEY, K. L.; YAP, A.; GILSON, P. R.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Insights and controversies into the role of the key apicomplexan invasion ligand, Apical Membrane Antigen 1. **Int. J. Parasitol.**, v. 44, n. 12, p. 853-857, 2014.

HAYNES, J. D.; DALTON, J. P.; KLOTZ, F. W.; MCGINNISS, M. H.; HADLEY, T. J.; HUDSON, D. E.; MILLER, L. H. Receptor-like specificity of a Plasmodium knowlesi malarial protein that binds to Duffy antigen ligands on erythrocytes. **J. Exp. Med.**, v. 167, n. 6, p. 1873-1888, 1988.

HEHL, A. B.; LEKUTIS, C.; GRIGG, M.E.; BRADLEY, P.J.; DUBREMETZ, J.F.; ORTEGA-BARRIA, E.; BOOTHROYD, J. C. Toxoplasma gondii homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 7078-7086, 2000.

HESSELGESSER, J.; HORUK, R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. **J. Neurovirol.**, v. 5, p. 13-26, 1999.

HESTER, J.; CHAN, E. R.; MENARD, D.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BARNWELL, J.; ZIMMERMAN, P. A.; SERRE, D. De novo assembly of a field isolate genome reveals novel Plasmodium vivax erythrocyte invasion genes. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 12, p. e2569, 2013.

HIETANEN, J.; CHIM-ONG, A.; CHIRAMANEWONG, T.; GRUSZCZYK, J.; ROOBSOONG, W.; THAM, W. H.; SATTABONGKOT, J.; NGUITRAGOOL, W. Gene Models, Expression Repertoire, and Immune Response of Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Proteins. **Infect. Immun.**, v. 84, n. 3, p. 677-685, 2015.

HOLDER, A. A.; FREEMAN, R. R. Biosynthesis and processing of a Plasmodium falciparum schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **J. Exp. Med.**, v. 156, n. 5, p. 1528-1538, 1982.

HOLDER, A. A. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1445-1456, 2009.

HOSSAIN, M. E.; DHAWAN, S.; MOHMMED, A. The cysteine-rich regions of Plasmodium falciparum RON2 bind with host erythrocyte and AMA1 during merozoite invasion. **Parasitol. Res.**, v. 110, n. 5, p. 1711-1721, 2012.

HOSTETLER, J. B.; LO, E.; KANJEE, U.; AMARATUNGA, C.; SUON, S.; SRENG, S.; MAO, S.; YEWHALAW, D.; MASCARENHAS, A.; KWIATKOWSKI, D. P.; FERREIRA, M. U.; RATHOD, P. K.; YAN, G.; FAIRHURST, R. M.; DURAISINGH, M. T.; RAYNER, J. C. Independent Origin and Global Distribution of Distinct Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Gene Duplications. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 10, p. e0005091, 2016.

HOWELL, S. A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BLACKMAN, M. J. Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 33, p. 31311-31320, 2001.

HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; MENDIS, K. N.; SMITH, D. L.; CIBULSKIS, R. E.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, n. 95, p. 15–34, 2016.

HUANG, K.; WU, H. Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection: From Vaccine to Antibody. **Microbiol. Spectr.**, v. 2, n. 4, p. 1-12, 2014.

JENS, E.; PAGLIARINI, T.; NOVARETTI, M. C. Z. Sistema grupo sanguíneo Duffy: Biologia e prática transfusional. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 2, p. 110-119, 2005.

JIANG, J.; BARNWELL, J. W.; EYER, E. V.; GALINSKI, M. R. Plasmodium vivax merozoite surface protein-3 (PvMSP3): expression of an 11 member multigene family in blood-stage parasites. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63888, 2013.

KANO, F. S.; SANCHEZ, B. A.; SOUSA, T. N.; TANG, M. L.; SALIBA, J.; OLIVEIRA, F. M.; NOGUEIRA, P. A.; GONÇALVES, A. Q.; FONTES, C. J.; SOARES, I. S.; BRITO, C. F.; ROCHA, R. S.; CARVALHO, L. H. Plasmodium vivax Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Trop. Med. Int. Health**, v. 17, n. 8, p. 989-1000, 2012.

KANO, F. S.; SOUZA-SILVA, F. A.; TORRES, L. M.; LIMA, B. A.; SOUSA, T. N.; ALVES, J. R.; ROCHA, R. S.; FONTES, C. J.; SANCHEZ, B. A.; ADAMS, J. H.; BRITO, C. F.; PIRES, D. E.; ASCHER, D. B.; SELL, A. M.; CARVALHO, L. H. The Presence, Persistence and Functional Properties of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 12, p. e0005177, 2016.

KARIUKI MM, LI X, YAMODO I, CHISTI AH, OH SS. Two Plasmodium falciparum merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.338, n. 4, p.1690-1695, 2005.

KASEHAGEN, L. J.; MUELLER KINIBORO, B.; BOCKARIE, M. J.; REEDER, J. C.; KAZURA, J. W.; KASTENS, W.; MCNAMARA, D. T.; KING, C. H.; WHALEN, C. C.; ZIMMERMAN, P. A. Reduced Plasmodium vivax Erythrocyte Infection in PNG Duffy Negative Heterozygotes. **Plos One**, v. 2, n. 3, p. e336, 2007.

KEMPIŃSKA-PODHORODECKA, A.; KNAP, O.; DROZD, A.; KACZMARCZYK, M.; PARAFINIUK, M.; PARCZEWSKI, M.; CIECHANOWICZ, A. Analysis for genotyping Duffy blood group in inhabitants of Sudan, the fourth cataract of the Nile. **Malar. J.**, v. 11, n. 115, p. 1- 6, 2012.

KIM, S. H.; HWANG, S. Y.; LEE, Y. S.; CHOI, I. H.; PARK, S. G.; KHO, W. G. Single-chain antibody fragment specific for Plasmodium vivax Duffy binding protein. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 6, p. 726-731, 2007.

KING, C. L.; MICHON, P.; SHAKRI, A. R.; MARCOTTY, A.; STANISIC, D.; ZIMMERMAN, P. A.; COLE-TOBIAN, J. L.; MUELLER, I.; CHITNIS, C. E. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. **PNAS**, v. 105, n. 24, p. 8363-8368, 2008.

KING, C. L.; ADAMS, J. H.; XIANLI, J.; GRIMBERG, B. T.; MCHENRY, A. M.; GREENBERG, L. J.; SIDDIQUI, A.; HOWES, R. E.; DA SILVA-NUNES, M.; FERREIRA, M. U.; ZIMMERMAN, P. A. Fya/Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to Plasmodium vivax malaria. **PNAS**, v. 108, n. 50, p. 20113-20118, 2011.

KOCH, M.; BAUM, J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. **Cell Microbiol.**, v. 18, n. 3, p. 319-329, 2016.

KOEPFLI, C.; COLBORN, K. L.; KINIBORO, B.; LIN, E.; SPEED, T. P.; SIBA, P. M.; FELGER, I.; MUELLER, I. A high force of plasmodium vivax blood-stage infection drives the rapid acquisition of immunity in papua new guinean children. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 9, p. e2403, 2013.

KOUSSIS, K.; WITHERS-MARTINEZ, C.; YEOH, S.; CHILD, M.; HACKETT, F.; KNUEPFER, E.; JULIANO L.; WOHLBIER, U.; BUJARD, H.; BLACKMAN, M. J. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. **EMBO J.**, v. 28, n. 6, p. 725-735, 2009.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite a new theory of malaria relapse. **Tras. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 1, p. 1-11, 1985.

LACERDA, M. V.; FRAGOSO, S. C.; ALECRIM, M. G.; ALEXANDRE, M. A.; MAGALHÃES, B. M.; SIQUEIRA, A. M.; FERREIRA, L. C.; ARAÚJO, J. R.; MOURÃO, M. P.; FERRER, M.; CASTILLO, P.; MARTIN-JAULAR, L.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; DEL PORTILLO, H.; ORDI, J.; ALONSO, P. L.; BASSAT, Q. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of Plasmodium vivax malaria: to what extent does this parasite kill? **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, n. 8, p. 67-74, 2012.

LADEIA-ANDRADE, S.; FERREIRA, M. U.; SCOPEL, K. K.; BRAGA, E. M.; BASTOS, M. DA S.; WUNDERLICH, G.; COURA, J. R. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 943-951, 2007.

LADEIA-ANDRADE, S.; FERREIRA, M. U.; DE CARVALHO, M. E.; CURADO, I.; COURA, J. R. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 3, p. 452-459, 2009.

LAMARQUE, M.; BESTEIRO, S.; PAPOIN, J.; ROQUES, M.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; MORLON-GUYOT, J.; DUBREMETZ, J. F.; FAUQUENOY, S.; TOMAVO, S.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BOULANGER, M. J.; BENTLEY, G. A.; LEBRUN, M. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. **PLoS Pathog.**, v.7, n. 2, p.e1001276, 2011.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LIMA-JUNIOR, J. C.; TRAN, T. M.; MEYER, E. V.; SINGH, B.; DE-SIMONE, S. G.; SANTOS, F.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; MORENO, A.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to lasmodium vivax merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. **Vaccine**, v. 26, n. 51, p. 6645-6654, 2008.

LIMA-JUNIOR, J.; JIANG, J.; RODRIGUES-DA-SILVA, R.; BANIC, D.; TRAN, T.; RIBEIRO, R.; MEYER, V. S. E.; DE-SIMONE, S. G.; SANTOS, F.; MORENO, A.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-3 $\alpha$  (PvMSP-3 $\alpha$ ) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1801-1811, 2011.

LIN, E.; KINIBORO, B.; GRAY, L.; DOBBIE, S.; ROBINSON, L.; LAUMAEA, A.; SCHÖPFLIN, S.; STANISIC, D.; BETUELA, I.; BLOOD-ZIKURSH, M.; SIBA, P.; FELGER, I.; SCHOFIELD, L.; ZIMMERMAN, P.; MUELLER, I. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9047, 2010.

LO, E.; YEWHALAW, D.; ZHONG, D.; ZEMENE, E.; DEGEFA, T.; TUSHUNE, K.; HA, M.; LEE, M.; JAMES, A. A.; YAN, G. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria among Duffy-positive and Duffy-negative populations in Ethiopia. **Malar. J.**, v. 14, n. 84, 2015.

LONGLEY, R. J.; SATTABONGKOT, J.; MUELLER, I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. **Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 154-170, 2016.

LUNDQUIST, R.; NIELSEN, L. K.; JAFARSHAD, A.; SOESOE, D.; CHRISTENSEN, L. H.; DRUILHE, P.; DZIEGIEL, M. H. Human recombinant antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 cloned from peripheral blood leukocytes of individuals with immunity to malaria demonstrate antiparasitic properties. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 6, p. 3222-3231, 2006.

MAESTRE, A.; MUSKUS, C.; DUQUE, V.; AGUDELO, O.; LIU, P.; TAKAGI, A.; NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H.; SIM, K. L.; HOFFMAN, S. L.; CORRADIN, G.; VELEZ, I. D.; WANG, R. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11437, 2010.

MAIER AG, DURASINGH MT, REEDER JC, PATEL SS, KAZURA JW, ZIMMERMAN PA, COWMAN AF. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. **Nat. Med.**, v. 9, n. 1, p. 87-92, 2003.

MALLERET, B.; LI, A.; ZHANG, R.; TAN, K. S.; SUWANARUSK, R.; CLASER, C.; CHO, J. S.; KOH, E. G.; CHU, C. S.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; NG, M. L.; GINHOUX, F.; NG, L. G.; LIM, C. T.; NOSTEN, F.; SNOUNOU, G.; RÉNIA, L.; RUSSELL, B. *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1314-1324, 2015.

MARTINS-CAMPOS, K. M.; PINHEIRO, W. D.; VÍTOR-SILVA, S.; SIQUEIRA, A. M.; MELO, G. C.; RODRIGUES, I. C.; FÉ, N. F.; BARBOSA, M. D.; TADEI, W. P.; GUINOVART, C.; BASSAT, Q.; ALONSO, P. L.; LACERDA, M. V.; MONTEIRO, W. M. Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. **Malar. J.**, v. 11, n. 351, p. 1-9, 2012.

MASKUS, D. J.; BETHKE, S.; SEIDEL, M.; KAPELSKI, S.; ADDAI-MENSAH, O.; BOES, A.; EDGÜ, G.; SPIEGEL, H.; REIMANN, A.; FISCHER, R.; BARTH, S.; KLOCKENBRING, T.; FENDEL, R. Isolation, production and characterization of fully human monoclonal antibodies directed to *Plasmodium falciparum* MSP10. **Malar. J.**, v. 14, n. 276, p. 1-16, 2015.

MASKUS, D. J.; KRÓLIK, M.; BETHKE, S.; SPIEGEL, H.; KAPELSKI, S.; SEIDEL, M.; ADDAI-MENSAH, O.; REIMANN, A.; KLOCKENBRING, T.; BARTH, S.; FISCHER, R.; FENDEL, R. Characterization of a novel inhibitory human monoclonal antibody directed against *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 39462, 2016.

MATUSCHEWSKI, K. Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. **Cell Microbiol.**, v. 8, n. 10, p. 1547-1556, 2006.

MCMANUS, K. F., TARAVELLA, A. M., HENN, B. M., BUSTAMANTE, C. D., SIKORA, M., CORNEJO, O. E. Population genetic analysis of the DARC locus (Duffy) reveals adaptation from standing variation associated with malaria resistance in humans. **PLoS Genet.**, v. 13, n. 3, p. e1006560, 2017.

MEDEIROS, M. M.; FOTORAN, W. L.; DALLA MARTHA, R. C.; KATSURAGAWA, T. H.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; WUNDERLICH, G. Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens MSP5, MSP9 and EBA175 is associated to clinical protection in the Brazilian Amazon. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, n. 608, p. 1-19, 2013.

MÉNARD, D.; BOUCHIER, C.; HENRY-HALLDIN, C.; GRAY, L. R.; RATSIMBASOA, A.; THONIER, V.; CAROD, J. F.; DOMARLE, O.; COLIN Y. V. E. S.; BERTRAND, O.; PICOT, J.; KING, C. L.; GRIMBERG, B. T.; PUIJALON, O. M.; ZIMMERMAN, P. A. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **PNAS**, v. 107, n. 13, p. 5967-5971, 2010.

MÉNARD, D.; CHAN, E. R.; BENEDET, C.; RATSIMBASOA, A.; KIM, S.; CHIM, P.; DO, C.; WITKOWSKI, B.; DURAND, R.; THELLIER, M.; SEVERINI, C.; LEGRAND, E.; MUSSET, L.; NOUR, B. Y.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; SERRE, D.; ZIMMERMAN, P. A. Whole genome sequencing of field isolates reveals a common duplication of the Duffy binding protein gene in Malagasy *Plasmodium vivax* strains. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.7, n. 11, p. e2489, 2013.

MENDES, C.; DIAS, F.; FIGUEIREDO, J.; MORA, V. G.; CANO, J.; DE SOUSA, B.; DO ROSÁRIO, V. E.; BENITO, A.; BERZOSA, P.; AREZ, A. P. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 6, p. e1192, 2011.

MICHON, P. A.; AREVALO-HERRERA, M.; FRASER, T.; HERRERA, S.; ADAMS, J. H. Serologic responses to recombinant Plasmodium vivax Duffy binding protein in a Colombian village. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 4, p. 597-599, 1998.

MICHON, P.; COLE-TOBIAN, J. L.; DABOD, E.; SCHOEPFLIN, S.; IGU, J.; SUSAPU, M.; TARONGKA, N.; ZIMMERMAN, P. A.; REEDER, J. C.; BEESON, J. G.; SCHOFIELD, L.; KING, C. L.; MUELLER, I. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 6, p. 997-1008, 2007.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; DVORAK, J. A.; MCGINNISS, M. H.; ROTHMAN, I. K. Erythrocyte receptors for (Plasmodium knowlesi) malaria: Duffy blood group determinants. **Science**, v. 189, n. 4202, p. 561-563, 1975.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNISS, M. H. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks - The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **N. Engl. J. Med.**, v. 295, n. 6, p. 302-304, 1976.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673 – 679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resumo epidemiológico por local de notificação nacional: Brasília: SIVEP-Malária, SVS/MS, 2015. Disponível em: [http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/32/Mapa-de-risco\\_malaria\\_2015.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/32/Mapa-de-risco_malaria_2015.pdf). Acesso 29 Jun 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, 2010. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_pratico\\_malaria.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf). Acesso 10 Jan 2015.

MOON, R. W.; HALL, J.; RANGKUTI, F.; HO, Y. S.; ALMOND, N.; MITCHELL, G. H.; PAIN, A.; HOLDER, A. A.; BLACKMAN, M. J. Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen Plasmodium knowlesi to continuous culture in human erythrocytes. **PNAS**, v. 110, n. 2, p. 531-536, 2013.

MOURÃO, L. C.; MORAIS, C. G.; BUENO, L. L.; JIMENEZ, M. C.; SOARES, I. S.; FONTES, C. J.; GUIMARÃES LACERDA, M. V.; XAVIER, M. S.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; BRAGA, E. M. Naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1<sub>19</sub> and PvMSP-3 $\alpha$ <sub>359-798</sub>) and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. **Microbes Infect.**, v. 14, n. 9, p.730-739, 2012.

MOUQUET, H.; SCHEID, J. F.; ZOLLER, M. J.; KROGSGAARD, M.; OTT, R. G.; SHUKAIR, S.; ARTYOMOV, M. N.; PIETZSCH, J.; CONNORS, M.; PEREYRA, F.; WALKER, B. D.; HO, D. D.; WILSON, P. C.; SEAMAN, M. S.; EISEN, H. N.; CHAKRABORTY, A. K.; HOPE, T. J.; RAVETCH, J. V.; WARDEMANN, H.; NUSSENZWEIG, M. C. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. **Nature**, n. 467, p. 591-595, 2010.

MUELLENBECK, M. F.; UEBERHEIDE, B.; AMULIC, B.; EPP, A.; FENYO, D.; BUSSE, C. E.; ESEN, M.; THEISEN, M.; MORDMÜLLER, B.; WARDEMANN, H. Atypical and classical memory B cells produce *Plasmodium falciparum* neutralizing antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 210, n. 2, p. 389-399, 2013.

MURPHY, P. M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 593-633, 1994.

NARUM, D. L.; THOMAS, A. W. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 67, n. 1, p. 59-68, 1994.

NEOTE, K.; MAK, J. Y.; KOLAKOWSKI, L. F.; SCHALL, T. J. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. **Blood**, v. 84, n. 1, p. 44-52, 1994.

NGASSA MBENDA, H. G.; DAS, A. Molecular Evidence of *Plasmodium vivax* Mono and Mixed Malaria Parasite Infections in *Duffy*-Negative Native Cameroonians. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e103262, 2014.

NGASSA MBENDA, H. G.; DAS, A. An Additional Observation of *Plasmodium Vivax* Malaria Infection in *Duffy*-Negative Individuals From Cameroon. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 10, n. 6, p. 682-686, 2016.

NICOLETE, V. C.; FRISCHMANN, S.; BARBOSA, S.; KING, C. L.; FERREIRA, M. U. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. **J. Infect. Dis.**, v. 214, n. 10, p. 1539-1546, 2016

NOGUEIRA, P. A.; ALVES, F. P.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; PEIN, O.; SANTOS, N. R.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; CAMARGO, E. P.; DEL PORTILLO, H. A. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 5, p. 2726-2733, 2006.

NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, n. 1, p. 30-36, 2012.

NTUMNGIA, F. B.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Finding the sweet spots of inhibition: understanding the targets of a functional antibody against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, n. 12, p. 1055-1062, 2012.

NTUMNGIA, F. B.; SCHLOEGEL, J.; BARNES, S. J.; MCHENRY, A. M.; SINGH, S.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Conserved and variant epitopes of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 3, p. 1203-1208, 2012b.

NTUMNGIA, F. B.; THOMSON-LUQUE, R.; PIRES, C. V.; ADAMS, J. H. The role of the human Duffy antigen receptor for chemokines in malaria susceptibility: current opinions and future treatment prospects. **J. Receptor Ligand Channel Res.**, v. 9, p. 1-11, 2016a.

NTUMNGIA, F. B.; THOMSON-LUQUE, R.; TORRES, L. DE M.; GUNALAN, K.; CARVALHO, L. H.; ADAMS, J. H. A Novel Erythrocyte Binding Protein of Plasmodium vivax Suggests an Alternate Invasion Pathway into Duffy-Positive Reticulocytes. **Mbio**, v. 7, n. 4, p. e01261-16, 2016b.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; VARGAS-SERRATO, E.; BARNWELL, J. W.; MORENO, A.; GALINSKI, M. R. Immunogenicity of Plasmodium vivax merozoite surface protein-9 recombinant proteins expressed in E. coli. **Vaccine**, v. 22, n. 15-16, p. 2023-2030, 2004.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malar. J.**, v.9, n. 115, p. 1-15, 2010.

OLSSON, M. L.; SMYTHE, J. S.; HANSSON, C.; POOLE, J.; MALLINSON, G.; JONES, J.; AVENT, N. D.; DANIELS, G. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. **Br. J. Haematol.**, v. 103, n. 4, p. 1184-1191, 1998.

ORLANDI, P. A.; KLOTZ, F. W.; HAYNES, J. D. A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of Plasmodium falciparum recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A. **J. Cell Biol.**, v. 116, n. 4, p. 901-909, 1992.

PACHEBAT, J. A.; KADEKOPPALA, M.; GRAINGER, M.; DLUZEWSKI, A. R.; GUNARATNE, R. S.; SCOTT-FINNIGAN, T. J.; OGUN, S. A.; LING, I. T.; BANNISTER, L. H.; TAYLOR, H. M.; MITCHELL, G. H.; HOLDER, A. A. Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 151, n. 1, p. 59-69, 2007.

Pan american health organization. Disponível em: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875) . Acesso 29 Jun 2017.

PAUL, A. S.; EGAN, E. S.; DURASINGH, M. T. Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 22, n. 3, p. 220-226, 2015.

PAYNE, R. O.; SILK, S. E.; ELIAS, S. C.; MILNE, K. H.; RAWLINSON, T. A.; LLEWELLYN, D.; SHAKRI, A. R.; JIN, J.; LABBÉ, G. M.; EDWARDS, N. J.; POULTON, I. D.; ROBERTS, R.; FARID, R.; JØRGENSEN, T.; ALANINE, D. G.; DE CASSAN, S. C.; HIGGINS, M. K.; OTTO, T. D.; MCCARTHY, J. S.; DE JONGH, W. A.; NICOSIA, A.; MOYLE, S.; HILL, A. V.; BERRIE, E.; CHITNIS, C. E.; LAWRIE, A. M.; DRAPER, S. J. Human vaccination against Plasmodium vivax Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. **JCI Insight**, v. 2, n. 12, p. e93683, 2017.

PEARSON, R. D.; AMATO, R.; AUBURN, S.; MIOTTO, O.; ALMAGRO-GARCIA, J.; AMARATUNGA, C.; SUON, S.; MAO, S.; NOVIYANTI, R.; TRIMARSANTO, H.; MARFURT, J.; ANSTEY, N. M.; WILLIAM, T.; BONI, M. F.; DOLECEK, C.; HIEN, T. T.; WHITE, N. J.; MICHON, P.; SIBA, P.; TAVUL, L.; HARRISON, G.; BARRY, A.; MUELLER, I.; FERREIRA, M. U.; KARUNAWEEERA, N.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; GAO, Q.; HUBBART, C.; HART, L.; JEFFERY, B.; DRURY, E.; MEAD, D.; KEKRE, M.; CAMPINO, S.; MANSKE, M.; CORNELIUS, V. J.; MACINNIS, B.; ROCKETT, K. A.; MILES, A.; RAYNER, J. C.; FAIRHURST, R. M.; NOSTEN, F.; PRICE, R. N.; KWIATKOWSKI, D. P. Genomic analysis of local variation and recent evolution in *Plasmodium vivax*. **Nat. Genet.**, v. 48, n. 8, p. 959-964, 2016.

PÍSAČKA, M.; MARINOV, I.; KRÁLOVÁ, M.; KRÁLOVÁ, J.; KOŘÁNOVÁ, M.; BOHONĚK, M.; SOOD, C.; OCHOA-GARAY, G. FY\*A silencing by the GATA-motif variant FY\*A (-69C) in a Caucasian family. **Transfusion**, v. 55, n. 11, p. 2616-2619, 2015.

PRICE, R. N.; DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 22, n. 5, p. 430-435, 2009.

RAYNER, J. C.; GALINSKY, M. R.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. W. Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoites protein that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelli* adhesive proteins involved in host cell and invasion. **PNAS**, v. 97, n. 17, 2000.

RAYNER, J. C.; CORREDOR, V.; FELDMAN, D.; INGRAVALLO, P.; IDERABDULLAH, F.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3 alpha is limited to specific domains. **Parasitology**, v. 125, n. 5, p. 393-405, 2002.

RECHT, J.; SIQUEIRA, A. M.; MONTEIRO, W. M.; HERRERA, S. M.; HERRERA, S.; LACERDA, M. V. G. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malar. J.**, v. 16, n. 173, p. 1-18, 2017.

REMARQUE, E. J.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 2, p. 74-84, 2008.

RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; MARTINS DA SILVA, J. H.; SINGH, B.; JIANG, J.; MEYER, E. V.; SANTOS, F.; BANIC, D. M.; MORENO, A.; GALINSKI, M. R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LIMA-JUNIOR, J. C. 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**, v. 11, n. 1, p. e0146951, 2016.

RODRIGUES, M. H.; RODRIGUES, K. M.; OLIVEIRA, T. R.; CÔMODO, A. N.; RODRIGUES, M. M.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; SOARES, I. S. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 2, p. 185-192, 2005.

RUSSO, G.; FAGGIONI, G.; PAGANOTTI, G. M.; DONGHO, G. B. D.; POMPONI, A.; SANTIS, R., TEBANO, A.; MBIDA, M.; SOBZE, M. S.; VULLO, V.; REZZA, G.; LISTA, F. R. Molecular evidence of *Plasmodium vivax* infection in Duffy negative symptomatic individuals from Dschang, West Cameroon **Malar. J.**, v. 16, n. 1, p. 74-89, 2017.

SÁNCHEZ-ARCILA, J. C.; DE FRANÇA, M. M.; PEREIRA, V. A.; VASCONCELOS, M. P.; TÊVA, A.; PERCE-DA-SILVA, D. DE S.; NETO, J. R.; APRÍGIO, C. J.; LIMA-JUNIOR, J. DA C.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; BANIC, D. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. 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.**, v. 14, n. 442, p. 1-11, 2015.

SARKAR, R., AJJAMPUR, S. S., WARD, H. D., KANG, G., NAUMOVA, E. N.. Analysis of human immune responses in quasi-experimental settings: tutorial in biostatistics. **BMC Med. Res. Methodol.**, v. 12, p. 1, 2012.

SCHOOF, T.; KLEIN, F.; BRAUNSCHWEIG, M.; KREIDER, E. F.; FELDMANN, A.; NOGUEIRA, L.; OLIVEIRA, T.; LORENZI, J. C.; PARRISH, E. H.; LEARN, G. H.; WEST, A. P. J. R.; BJORKMAN, P. J.; SCHLESINGER, S. J.; SEAMAN, M. S.; CZARTOSKI, J.; MCEL RATH M. J.; PFEIFER, N.; HAHN, B. H.; CASKEY, M.; NUSSENZWEIG, M. C. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. **Science**, v. 352, n. 6288, p. 997-1001, 2016.

SELLAMI, M. H.; KAABI, H.; MIDOUNI, B.; DRIDI, A.; MOJAAT, N.; BOUKEF, M. K.; HMIDA, S. Duffy blood group system genotyping in an urban Tunisian population. **Ann. Hum. Biol.**, v. 35, n. 4, p. 406-415, 2008.

SHAKRI, A. R.; RIZVI, M. M.; CHITNIS, C. E. Development of quantitative receptor-ligand binding assay for use as a tool to estimate immune responses against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein Region II. **J. Immunoassay Immunochem.**, v. 33, n. 4, p. 403-413, 2012.

SHAW-SALIBA, K.; THOMSON-LUQUE, R.; OBALDÍA, N. 3RD.; NUÑEZ, M.; DUTARY, S.; LIM, C.; BARNES, S.; KOCKEN, C. H.; DURAISINGH, M. T.; ADAMS, J. H.; PASINI, E. M. Insights into an Optimization of *Plasmodium vivax* Sal-1 In Vitro Culture: The Aotus Primate Model. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 7, p. e0004870, 2016.

SIM, B. K.; ORLANDI, P. A.; HAYNES, J. D.; KLOTZ, F. W.; CARTER, J. M.; CAMUS, D.; ZEGANS, M. E.; CHULAY, J. D. Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. **J. Cell Biol.**, v. 111, n. 5, p. 1877-1884, 1990.

SINGH, S.; PANDEY, K.; CHATTOPADHAYAY, R.; YAZDANI, S. S.; LYNN, A.; BHARADWAJ, A.; RANJAN, A.; CHITNIS, C. Biochemical, biophysical and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding Protein. **J. Bio. Chem.**, v. 276, v. 20, p. 17111-17116, 2001.

SINGH, S. K.; SINGH, A. P.; PANDEY, S.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; SHARMA, A. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. **Biochem. J.**, v. 374, n. 1, p. 193-198, 2003.

SIQUEIRA, A. M.; LACERDA, M. V.; MAGALHÃES, B. M.; MOURÃO, M. P.; MELO, G. C.; ALEXANDRE, M. A.; ALECRIM, M. G.; KOCHAR, D.; KOCHAR, S.; KOCHAR, A.; NAYAK, K.; DEL PORTILLO, H.; GUINOVART, C.; ALONSO, P.; BASSAT, Q. Characterization of Plasmodium vivax-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. **BMC Med.**, v. 3, n. 57, p. 1-14, 2015.

SIQUEIRA, A. M.; MESONES-LAPOUBLE, O.; MARCHESINI, P.; SAMPAIO, V. DE S.; BRASIL, P.; TAUIL, P. L.; FONTES, C. J.; COSTA, F. T. M.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; LACERDA, M. V. G.; DAMASCENO C. P.; SANTELLI, A. C. S. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 6, p. 87-96, 2016.

SOARES, I. S.; OLIVEIRA, S. G.; SOUZA, J. M.; RODRIGUES, M. M. \_ Antibody response to the N and C-terminal regions of the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of P. vivax malaria in the north of Brazil. **Acta Trop.**, v. 72, n. 1, p. 13-24, 1999.

SOUZA, T. N.; CERÁVOLO, I. P.; FONTES, F. C. J.; COUTO, A.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among Plasmodium vivax isolates from the Brazilian Amazon area. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 146, n.2, p. 251-254, 2006.

SOUZA, T. N.; TARAZONA-SANTOS, E. M.; WILSON, D. J.; MADUREIRA, A. P.; FALCAO, P. R. K.; FONTES, C. J. F.; GIL, L. H. S.; FERREIRA, M. U.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. A. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian Plasmodium vivax populations. **Malar. J.**, v. 9, p. 334-339, 2010.

SOUZA-SILVA, F. A.; DA SILVA-NUNES, M.; SANCHEZ, B. A.; CERAVOLO, I. P.; MALAFRONTTE, R. S.; BRITO, C. F.; FERREIRA, M. U.; CARVALHO, L. H. Naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, n. 2, p. 185-193, 2010.

SOUZA-SILVA, F. A.; TORRES, L. M.; SANTOS-ALVES, J. R.; TANG, M. L.; SANCHEZ, B. A.; SOUSA, T. N.; FONTES, C. J.; NOGUEIRA, P. A.; ROCHA, R. S.; BRITO, C. F.; ADAMS, J. H.; KANO, F. S.; CARVALHO, L. H. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93782, 2014.

STANISIC, D. I.; JAVATI, S.; KINIBORO, B.; LIN, E.; JIANG, J.; SINGH, B.; ESMERALDA, V.; MEYER, S.; SIBA, P.; KOEPFI, C.; FELGER, I.; GALINSKI, M. R.; MUELLER, I. Naturally Acquired Immune Responses to P. vivax Merozoite Surface Protein 3 $\alpha$  and Merozoite Surface Protein 9 Are Associated with Reduced Risk of P. vivax Malaria in Young Papua New Guinean Children. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 11, p. e2498, 2013.

SUÁREZ-MUTIS, M. C.; CUERVO, P.; LEORATTI, F. M.; MORAES-AVILA, S. L.; FERREIRA, A. W.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic Plasmodium vivax infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 49, n. 3, p. 159-164, 2007.

TABLL, A.; ABBAS, A.; T.; EL-KAFRAWY, S.; WAHID, A. Monoclonal antibodies: Principles and applications of immunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. **World J. Hepatol.**, v. 7, n. 22, p. 2369–2383, 2015.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THAM, W. H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. Plasmodium vivax vaccine research - we've only just begun. **Int. J. Parasitol.**, v. 47, n. 2-3, p. 111-118, 2017.

THOMPSON, J. K.; TRIGLIA, T.; REED, M. B.; COWMAN, A. F. A novel ligand from Plasmodium falciparum that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes. **Mol. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 47-58, 2001.

TILLER, T.; MEFFRE, E.; YURASOV, S.; TSUIJI, M.; NUSSENZWEIG, M. C.; WARDEMANN, H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. **J. Immunol. Methods**, v. 329, n. 1-2, p. 112-124, 2008.

TSUBOI, T.; KAPPE, S. H.; AL-YAMAN, F.; PRICKETT, M. D.; ALPERS, M.; ADAMS, J. H. Natural variation within the principal adhesion domain of the Plasmodium vivax duffy binding protein. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 12, p. 5581-5586, 1994.

TOMAZ, F. M.; DA CRUZ FURINI, A. A.; CAPOBIANCO, M. P.; PÓVOA, M. M.; TRINDADE, P. C.; FRAGA, V. D.; CONCEIÇÃO, L. M.; DE AZEVEDO, L. R.; OLIANI, S. M.; CASSIANO, G. C.; CAVASINI, C. E.; DOS SANTOS, S. E.; MACHADO, R. L. Humoral immune responses against the malaria vaccine candidate antigen Plasmodium vivax AMA-1 and IL-4 gene polymorphisms in individuals living in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Cytokine**, v. 74, n.2, p. 273-8, 2015.

TOURNAMILLE, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J. P.; LE VAN KIM, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nat. Genet.**, v. 10, n. 2, p. 224-228, 1995.

TOURNAMILLE, C.; LE VAN KIM, C.; GANE, P.; LE PENNEC, P. Y.; ROUBINET, F.; BABINET, J.; CARTRON, J. P.; COLIN, Y. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. **Blood**, v. 92, n. 6, p. 2147-2156, 1998.

TRAN, T. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; MORENO, A.; SANTOS, F.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; ALTMAN, J. D.; MEYER, E. V.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R. Comparison of IgG reactivities to Plasmodium vivax merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 2, p. 244-255, 2005.

VAIDA, F.; XU, R. Proportional hazards model with random effects. **Stat. Med.**, v. 19, n. 24, p. 3309-3324, 2000.

VALIZADEH, V.; ZAKERI, S.; MEHRIZI, A. A.; DJADID, N. D. Non-allele specific antibody responses to genetically distinct variant forms of Plasmodium vivax Duffy binding protein (PvDBP-II) in Iranians exposed to seasonal malaria transmission. **Acta Trop.**, v. 136, p. 89-100, 2014.

VALIZADEH, V.; ZAKERI, S.; MEHRIZI, A. A.; MIRKAZEMI, S.; DJADID, N. D. Natural acquired inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein (PvDBP-II) equally block erythrocyte binding of homologous and heterologous expressed PvDBP-II on the surface of COS-7 cells. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 205, n. 1, p. 85-95, 2016.

VANBUSKIRK, K. M.; SEVOVA, E.; ADAMS, J. H. Conserved residues in the Plasmodium vivax Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. **PNAS**, v. 101, n.44, p. 15754-15759, 2004a.

VANBUSKIRK, K. M.; COLE-TOBIAN, J. L.; BAISOR, M.; SEVOVA, E. S.; BOCKARIE, M.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Antigenic drift in the ligand domain of Plasmodium vivax duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 190, n. 9, p. 1556-1562, 2004b.

VARGAS-SERRATO, E.; BARNWELL, J. W.; INGRAVALLO, P.; PERLER, F. B.; GALINSKI, M. R. Merozoite surface protein-9 of Plasmodium vivax and related simian malaria parasites is orthologous to p101/ABRA of P. falciparum. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, n. 1, p. 41-52, 2002.

VENTURA, A.M.; CHAVES, T. DO S., MONTEIRO, J. C.; SEQUEIRA, C. G.; OHNISHI, M. D.; LIBONATI, R. M.; SOUSA, R. C.; SOUZA, J. M. Myocarditis associated with Plasmodium vivax malaria: a case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n. 6, p. 810-813, 2014.

VITOR-SILVA, S.; SIQUEIRA, A. M.; DE SOUZA SAMPAIO, V.; GUINOVART, C.; REYES-LECCA, R. C.; DE MELO, G. C.; MONTEIRO, W. M.; DEL PORTILLO, H. A.; ALONSO, P.; BASSAT, Q.; LACERDA, M. V. Declining malaria transmission in rural Amazon: changing epidemiology and challenges to achieve elimination. **Malar. J.**, v. 15, n. 266, p. 1-14, 2016.

WARDEMANN, H.; KOFER, J. Expression cloning of human B cell immunoglobulins. **Methods Mol Biol.**, v. 971, p. 93-111, 2013.

WATERS, A. P.; THOMAS, A. W.; DEANS, J. A.; MITCHELL, G. H.; HUDSON, D. E.; MILLER, L. H.; MCCUTCHAN, T. F.; COHEN, S. A merozoite receptor protein from Plasmodium knowlesi is highly conserved and distributed throughout Plasmodium. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 29, p. 17974-17979, 1990.

WOEHLBIER, U.; EPP, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J.; BUJARD, H. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite Plasmodium falciparum inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. **Malar J.**, v. 9, n. 77, p. 1-12, 2010.

WONGKIDAKARN, S.; MCHENRY, A. M.; SATTABONGKOT, J.; ADAMS, J. H.; CHOOTONG, P. Strain-Transcending Inhibitory Antibodies against Homologous and Heterologous Strains of Duffy Binding Protein region II. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0154577, 2016.

World Health Organization (WHO). World malaria report. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>. Acesso em: 16 Jun 2017.

WU, N. C.; WILSON, I. A. A Perspective on the Structural and Functional Constraints for Immune Evasion: Insights from Influenza Virus. **J. Mol. Biol.**, v. 429, n. 17, p. 2694-2709, 2017.

WURTZ, N.; LEKWEIRY, K. M.; BOGREAU, H.; PRADINES, B.; ROGIER, C.; BOUKHARY, A. O. M. S.; HAFID, J. E.; SALEM, M. S. O. A.; TRAPE, J. F.; BASCO, L. K.; BRIOLANT, S. Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual. **Malar. J.**, v. 10, n. 336, p. 2011.

ZIMMERMAN, P. A.; WOOLEY, I.; MANSINDE, G. L.; MILLER, S. M.; MCNAMARA, D. T.; HAZLETT, F.; MGONE, A. S.; ALPERS, M. P.; GENTON, B.; BOATIN, B. A.; KAZURA, J. W. Emergence of FY\*A null in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. **PNAS**, v. 24, p. 1-8, 13973-13977, 1999.

ZIMMERMAN, P. A.; FERREIRA, M. U.; HOWES, R. E.; MERCEREAU-PUIJALON, O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to Plasmodium vivax. **Adv. Parasitol.**, v. 81, n. 27-76, p. 1-42, 2013.

ZHOU, T.; LYNCH, R. M.; CHEN, L.; ACHARYA, P.; WU, X.; DORIA-ROSE, N. A.; JOYCE, M. G.; LINGWOOD, D.; SOTO, C.; BAILER, R. T.; ERNANDES, M. J.; KONG, R.; LONGO, N. S.; LOUDER, M. K.; MCKEE, K.; O'DELL, S.; SCHMIDT, S. D.; TRAN, L.; YANG, Z.; DRUZ, A.; LUONGO, T. S.; MOQUIN, S.; SRIVATSAN, S.; YANG, Y.; ZHANG, B.; ZHENG, A.; PANCERA, M.; KIRYS, T.; GEORGIEV, I. S.; GINDIN, T.; PENG, H. P.; YANG, A. S.; NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM, MULLIKIN, J. C.; GRAY, M. D.; STAMATATOS, L.; BURTON, D. R.; KOFF, W. C.; COHEN, M. S.; HAYNES, B. F.; CASAZZA, J. P.; CONNORS, M.; CORTI, D.; LANZAVECCHIA, A.; SATTENTAU, Q. J.; WEISS, R. A.; WEST, A. P. JR.; BJORKMAN, P. J.; SCHEID, J. F.; NUSSENZWEIG, M. C.; SHAPIRO, L.; MASCOLA, J. R.; KWONG, P. D. Structural Repertoire of HIV-1-Neutralizing Antibodies Targeting the CD4 Supersite in 14 Donors. **Cell**, v. 161, n. 6, p. 1280-1292, 2015.

**Tabela A1** – Proporção (%) de amostras dos indivíduos do assentamento rural no estado do Amazonas (n=1126), Remansinho, com anticorpos IgG para cinco variantes de *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP), três proteínas de superfície de merozóito de *P. vivax* e um antígeno estágio sanguíneo de *P. falciparum*, entre os anos de 2010-2013.

Data do inquérito	PvDBP			PvDBP		PvDBP		PvMSP-1 <sub>19</sub>	PvMSP-3 $\alpha$	PvMSP-9	PFEB-175	N° de amostras testadas (%)
	PvDBP Sal I	PvDBP AH	C	P	O							
03-05/2010	84,1	98,4	96,8	88,1	86,5	79,4	84,9	69,8	63,5	126/166 (75,9%)		
05-07/2010	93,3	92,6	87,7	78,5	81,6	77,3	63,8	55,2	50,3	163/278 (58,6%)		
03-04/2011	44,2	74,7	68,9	51,1	57,4	51,1	58,4	41,6	36,8	190/274 (69,3%)		
10-11/2011	52,2	90,8	79,9	56,5	65,2	72,3	48,9	21,7	22,8	184/290 (63,4%)		
04-05/2012	78,7	91,7	89,3	68,6	74,6	74,0	58,6	29,6	34,3	169/235 (71,9%)		
10-11/2012	56,6	77,8	62,4	52,4	56,6	63,5	23,8	30,2	12,7	189/261 (69,0%)		
04-05/2013	44,8	74,3	60,0	45,7	65,7	56,2	15,2	24,8	10,5	105/228 (46,0%)		
Todos os inquéritos	64,4	85,6	77,7	62,4	68,7	67,5	50,8	38,2	32,6	1126/1723 (65,3%)		

ANEXOS

# Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians

Vanessa C. Nicolete,<sup>1,2</sup> Sarah Frischmann,<sup>2</sup> Susana Barbosa,<sup>1</sup> Christopher L. King,<sup>2,3,a</sup> and Marcelo U. Ferreira<sup>1,a</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Center for Global Health and Diseases, Case Western Reserve University School of Medicine, and <sup>3</sup>Veteran Affairs Research Service, Louis B. Stokes VA Medical Center, Cleveland, Ohio

**Background.** Antibodies to the cysteine-rich domain II of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP) can inhibit binding of this parasite ligand to its receptor on red blood cells, the Duffy antigen/receptor for chemokines. These binding-inhibitory antibodies (BIABs) also inhibit *P. vivax* invasion of reticulocytes in vitro.

**Methods.** To investigate whether naturally acquired anti-PvDBP antibodies are associated with reduced risk of clinical malaria in a population exposed to low levels of *P. vivax* transmission, we measured total levels of immunoglobulin G antibodies to 5 PvDBP variants and used a functional in vitro assay to quantify their binding-inhibitory activity in a cohort of 466 rural Amazonians followed up for up to 37 months.

**Results.** No association between total immunoglobulin G antibody responses to any PvDBP variant and risk of symptomatic, laboratory-confirmed vivax malaria was observed in this cohort. However, a Cox proportional hazards model, adjusted for age, sex, and genotype for the Duffy antigen/receptor for chemokines, showed a >40% decrease in the prospective risk of clinical vivax malaria in subjects with the strongest BIAB responses (upper and middle terciles). High BIAB responses were mostly PvDBP variant transcending and stable over time.

**Conclusions.** Strong naturally acquired BIAB responses are associated with a reduced risk of clinical *P. vivax* malaria in rural Amazonians.

**Keywords.** malaria; antibodies; *Plasmodium vivax*; Duffy binding protein; Duffy antigen/receptor for chemokines; immunity; Amazon.

Clinical manifestations of *Plasmodium vivax* malaria are caused by asexual parasites multiplying inside red blood cells (RBCs). Children exposed to intense transmission experience repeated *P. vivax* malaria attacks during their first years of life, whereas adolescents and adults may harbor low-grade infections but usually remain free of symptoms once parasitized [1]. Naturally acquired immunity does not prevent infection but limits parasite multiplication and reduces the proportion of infections that progress to disease [2]. Clinical immunity also develops under the conditions of substantially lower *P. vivax* transmission that prevail in the Amazon. Although malaria episodes are experienced by children and adults, an increased proportion of infections remain asymptomatic in subjects with >5–8 years of continuous exposure to infection [3–5].

Several receptor-ligand interactions are required for *P. vivax* invasion of RBCs. A key step involves the cysteine-rich domain II of the *P. vivax* Duffy binding protein (PvDBP) and its cognate receptor on RBCs, the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). PvDBP binding to DARC is needed to form an irreversible junction between invading *P. vivax* merozoites and their host cells, immature RBCs known as reticulocytes [6]. RBCs lacking DARC are typically refractory to *P. vivax* infection [7].

Strong naturally acquired antibody responses to PvDBP are associated with reduced prospective risk of high-density parasitemia in Papua New Guinean children exposed to intense *P. vivax* transmission [8]. Children with high levels of binding-inhibitory antibodies (BIABs), which are able to inhibit PvDBP binding to DARC in vitro, are protected from subsequent *P. vivax* infections detected with microscopy [9]. Moreover, human anti-PvDBP antibodies purified from the serum of these children, as well as anti-Duffy binding protein antibodies elicited in immunized rabbits, can inhibit *P. vivax* invasion of reticulocytes in vitro [10].

To investigate whether naturally acquired anti-PvDBP antibodies reduce the risk of clinical malaria in a population exposed to low-level *P. vivax* transmission, we measured levels of immunoglobulin (Ig) G antibodies to 5 PvDBP variants in

Received 1 July 2016; accepted 24 August 2016.

<sup>a</sup>C. L. K. and M. U. F. contributed equally to this work.

Correspondence: M. U. Ferreira, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Ave Prof Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo, Brazil (muferre@usp.br).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiw407

a cohort of rural Amazonians and used a functional assay to quantify their binding-inhibitory activity. We show that high levels of BIABs, but not of total anti-PvDBP IgG antibodies, persist for several months, are variant transcending, and confer protection from subsequent clinical vivax malaria in this population.

## METHODS

### Cross-sectional Surveys

Between March 2010 and May 2013, 7 cross-sectional surveys were carried out in farming settlements scattered in the equatorial rain forest of Remansinho area, northwestern Brazil (Supplementary Figure 1). All inhabitants older than 3 months were invited to contribute 5-mL venous blood samples, irrespective of any clinical symptoms, for malaria diagnosis, antibody assays, and Duffy blood group genotyping [11]. Study protocols were approved by the National Human Research Ethics Committee of the Ministry of Health of Brazil (approval No. 551/2010). Written informed consent was obtained from all study participants or their parents or guardians.

### Malaria Diagnosis and Surveillance

Conventional microscopy of Giemsa-stained thick smears and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were used to diagnose malaria in cross-sectional surveys [11]. At least 100 fields were examined for malaria parasites by 2 experienced microscopists, under  $\times 1000$  magnification, before slides were declared negative. Species-specific primers were used to amplify a 100-base pair fragment of the 18S ribosomal RNA genes of *P. vivax* and *Plasmodium falciparum* by real-time qPCR, with a detection threshold of 2 parasites/microliter of blood [12]. To estimate the incidence of clinical malaria over the study period, trained local health workers carried out weekly house-to-house visits from March 2010 to October 2013. Thick smears were systematically obtained from subjects with fever, chills, headache, or any other malaria-related symptoms and or signs at the time of blood collection or those reporting these symptoms within the past 48 hours. Slide-positive subjects were treated according to the current malaria therapy guidelines of the Ministry of Health of Brazil [13].

### DARC Genotyping

TaqMan assays [14] were used to genotype 2 DARC polymorphisms: the T-33C substitution in the RBC-specific GATA1 transcription factor binding motif (*rs2814778*), which suppresses DARC expression on RBC surface (*FY\*B<sup>ES</sup>* allele), and the G125A polymorphism (*rs12075*), which defines the *FY\*B* (wild type) and *FY\*A* (mutated) alleles.

### Recombinant Antigens

We measured IgG antibodies to the following: (1) 5 variants (Sal I, AH, P, C, and O [8]) of the domain II (residues 194–521) of PvDBP [15]; (2) the C-terminal, 19-kDa region of *P. vivax* merozoite surface protein (MSP) 1 (PvMSP-1<sub>19</sub>), Belém strain,

kindly provided by Anthony Stowers (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health); (3) block II (nucleotides 1246–2058) of *P. vivax* MSP-3 $\alpha$  (PvMSP-3 $\alpha$ ) from the Belém strain [16]; (4) the N-terminal region (residues 34–193) of *P. vivax* MSP-9 (PvMSP-9) from the Belém strain [17], kindly provided by Mary Galinski (Emory University); and (5) the F2 region of *P. falciparum* erythrocyte-binding antigen (PfEBA) 175, kindly provided by Chetan Chitnis (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology).

### Bead-Based Multiplex Assay for Antibodies

Spectrally unique carboxylated xMAP microspheres (Luminex) coupled to recombinant proteins were used to detect antigen-specific total IgG antibodies [18]. Briefly, 1000 coupled beads per well for each antigen were incubated with patients' plasma at a 1:200 dilution in 96-well microplates (MultiScreen<sub>BV</sub> MSBVN1210; Millipore). R-phycoerythrin-conjugated, anti-human IgG (Jackson Immunoresearch) was used to detect antibody binding. Serially diluted plasma samples from a pool of infected adults from Papua New Guinea were used as positive controls, starting at 1:50 dilution, and plasma samples from 20 North Americans who had not been exposed to malaria served as negative controls. (We did not use samples from Amazonians as negative controls because we would be unable to rule out past exposure to malaria.) We read fluorescence from 75 beads per antigen on Bio-Plex 200 equipment with Bioplex Manager 6.1 software (Bio-Rad). The mean fluorescence intensity (MFI) obtained with negative controls for each antigen, plus 3 standard deviations, was used as the cutoff value to define a positive response. Quantitative results were expressed as reactivity indices, calculated as the sample MFI divided by the cutoff MFI value; an index  $>1$  was considered positive.

### Microplate-Based Binding Inhibition Assay

Functional assays were performed in duplicate to test plasma samples for the presence of BIABs [19]. Plasma samples were preincubated at 1:20 dilution with the recombinant Sal I variant of PvDBP (0.011  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; kindly provided by Niraj Tolia, Washington University School of Medicine) and transferred to Immulon 2B microplates (ThermoScientific) coated (at 12.5 ng per well) with the N-terminal region of the human DARC protein ligated to the Fc region of human IgG (nDARC-Fc). Bound PvDBP was detected by anti-PvDBP antibodies raised in rabbits (1:5000 dilution), followed by a horseradish peroxidase-conjugated goat, anti-rabbit IgG (Millipore) at 1:5000 dilution. As a positive control we used a human monoclonal antibody against PvDBP, Sal-I variant; plasma samples from unexposed North Americans served as negative controls. Net sample absorbance values (measured at 450 nm) were obtained after subtracting background absorbance readings from wells with neither nDARC-Fc nor plasma. The percentage of binding inhibition was calculated as  $1 - (\text{net sample absorbance}/\text{net control absorbance}) \times 100$ . To assess the variant specificity of

BIABs, we tested serially diluted plasma samples (from 1:20 to 1:640) from selected study participants and nonexposed controls for their ability to inhibit the binding of 3 PvDBP recombinant proteins (variants Sal I, P, and C) to solid-phase nDARC-Fc. The BIAB end-point titer was defined as the reciprocal of the highest plasma dilution at which a blocking-inhibitory activity  $\geq 90\%$  could still be detected.

#### ***pvd* Gene Sequencing**

To determine whether PvDBP variants in Remansinho differed from those expressed as recombinant antigens, we sequenced the domain II (nucleotide residues 870–1545) of the *pvd* gene from 46 local *P. vivax* isolates collected between 2010 and 2011. The 676–base pair target sequence was amplified with PCR [20] and sequenced on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Nucleotide sequences were deposited into the GenBank database (accession Nos. KP036999–KP037006).

#### **Statistical Analysis**

All analyses were performed with R statistical software (version 3.3.0). Proportions were compared using standard  $\chi^2$  tests or Mantel-Haenszel  $\chi^2$  tests for linear trend, while continuous variables were compared using the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Correlations were evaluated using nonparametric Spearman correlation. Statistical significance was defined at the 5% level; 95% confidence intervals (CIs) and interquartile ranges were estimated whenever appropriate.

Survival analysis was used to compare the time to the first clinical vivax malaria episode in subjects with varying levels of specific antibodies. The outcome was clinical vivax malaria, defined as a laboratory-confirmed infection with *P. vivax*, regardless of parasite density, in a subject with fever, headache, or any other malaria-related symptoms or signs at enrollment or reporting these symptoms in the past 48 hours. At each cross-sectional survey, study participants who were free of malaria infection (negative qPCR and microscopy) had their antibody levels measured. They were followed up until the next antibody status measurement. The unit of analysis was the time (in days) between the first (baseline) and the next antibody measurement, between the baseline antibody measurement and the date when subjects left the study or between the baseline antibody measurement and the next vivax malaria episode, whatever came first; each study participant contributed up to 7 observation periods.

We used mixed-effects Cox proportional hazards models to compare hazard ratios (HRs) for the time to the first clinical vivax malaria episode across terciles of antibody levels while adjusting for subjects' age and sex and for DARC genotype; the clustering of repeated observations within individuals at different time points was modeled as a random effect [21]. DARC-negative subjects were excluded from survival analysis because they are at negligible risk of vivax malaria [7]; all DARC-

positive subjects (regardless of their genotype) were included. A similar approach was used to analyze HRs for the time to the first clinical vivax malaria episode according to levels of anti-PvDBP BIABs. For this purpose, subjects were classified into terciles for the percentage of binding-inhibitory activity against the Sal I variant of PvDBP.

## **RESULTS**

#### **Naturally Acquired IgG Antibodies to PvDBP**

Overall, 466 study subjects were tested for antibodies at least once, 263 (56.4%) male and 203 (43.6%) female subjects with a median age of 26 years; 267 subjects (57.3%) contributed  $\geq 2$  samples. Between 62.4% and 85.6% of the 1126 plasma samples analyzed had IgG antibodies to individual PvDBP variants (Supplementary Table 1). The proportion of responders increased linearly with the age of plasma donors ( $P < .001$  for all PvDBP variants; Figure 1) and the levels of anti-PvDBP antibodies at enrollment correlated weakly, but positively, with the subjects' age ( $P < .001$  for all; Supplementary Table 2), consistent with a boosting effect due to repeated exposure to *P. vivax*.

#### **Sequence Diversity and Antibody Recognition of PvDBP Variants**

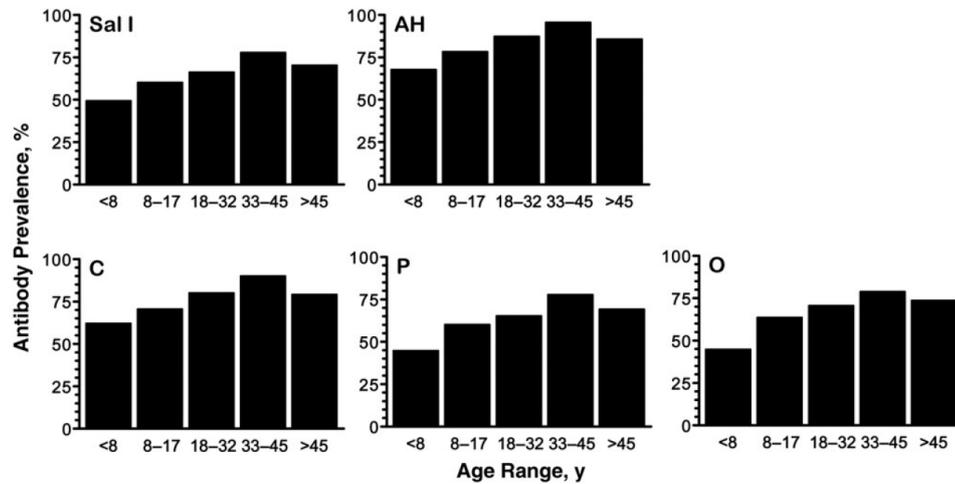
None of the 8 PvDBP variants characterized in Remansinho was identical to any PvDBP variant expressed as recombinant antigen (Table 1); pairwise differences between local variants and antigens ranged from 1 (AH vs BR7) to 8 amino acid residues (P vs BR1 and BR2). Interestingly, most study subjects recognized PvDBP variants to which they are most likely not exposed. Moreover, levels of IgG antibodies to different PvDBP recombinant proteins at study subjects' enrollment were highly correlated to each other ( $P < .001$  for all; Supplementary Table 3), suggesting that sequence diversity in PvDBP domain II of recombinant antigens had relatively little impact on specific IgG antibody measurements.

#### **Antibody Responses to Other Malaria Antigens**

IgG response rates were high for PvMSP-1<sub>19</sub> (67.5%) but substantially lower for PvMSP-3 $\alpha$  and PvMSP-9 (Supplementary Table 1). Only 32.6% of the samples had IgG antibodies to PfEBA-175, a member of the Duffy binding-like erythrocyte-binding protein (erythrocyte-binding antigen) family of *P. falciparum* with no known orthologue with significant sequence similarity in *P. vivax*. Levels of IgG antibodies to PvMSP-1<sub>19</sub>, PvMSP-9, and PfEBA-175, but not to PvMSP-3 $\alpha$ , correlated weakly but positively with the subjects' age (Supplementary Table 2).

#### **Malaria Prevalence and Antibody Levels Over Time**

The prevalence of laboratory-confirmed *P. vivax* infection (positive by microscopy and/or qPCR) varied markedly in Remansinho over 37 months of study, with an outbreak due to a near-clonal parasite expansion [22] around October 2011 (Figure 2, top panel). Accordingly, levels of IgG antibodies to PvDBP and PvMSP-1<sub>19</sub> (Figure 2; see also Supplementary Figure 2)



**Figure 1.** Prevalence of immunoglobulin G antibodies to 5 *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP) variants (Sal I, AH, C, P, and O) in rural Amazonians according to age. Study participants had 1–7 consecutive samples tested for antibodies; this figure shows antibody prevalence data at enrollment for 451 participants with known age. Age groups roughly correspond to quintiles, with 87–91 subjects in each group. Extended Mantel-Haenszel  $\chi^2$  tests for linear trend showed a significant increase in antibody prevalence with increasing age for all PvDBP variants ( $P < .001$ ).

mirrored changes in *P. vivax* prevalence over time, declining after the baseline survey but increasing after the outbreak. Very few *P. falciparum* infections were diagnosed during the first year of study, and none thereafter (Supplementary Figure 2). Median IgG antibody levels to PvMSP-3 $\alpha$ , PvMSP-9, and PfEBA-175 declined over time, with little or no increase during or after the *P. vivax* outbreak (Supplementary Figure 2). To further explore the antibody boosting effect of malaria

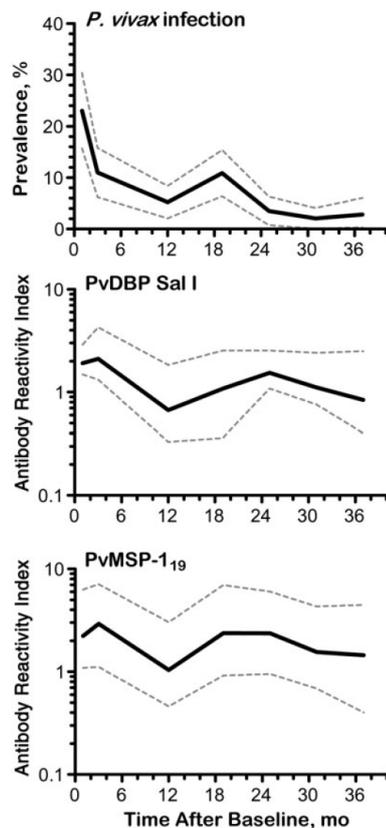
episodes, we compared antibody levels in paired plasma samples collected before and after a laboratory-confirmed *P. vivax* infection (Supplementary Methods) and observed increased levels of antibodies to PvDBP variants and PvMSP-1 $_{19}$  about 50 days after infection (Supplementary Figure 3). No similar increase in antibody response to PvMSP-3 $\alpha$ , PvMSP-9 (Supplementary Figure 3) or PfEBA-175 (data not shown) was observed after a *P. vivax* infection.

**Table 1.** Polymorphic Amino Acid Residues in PvDBP Variants Expressed as Recombinant Antigens and Those Characterized in 46 *P. vivax* Isolates From the Study Site (Remansinho, Brazil)

PvDBP Variant	Amino Acid Residue (Position According to Sal I Sequence) <sup>a</sup>													Proportion in Remansinho, %
	308	333	371	375	384	385	386	390	417	424	437	447	503	
Sal I	R	L	K	N	D	E	K	R	N	L	W	S	I	0
AH	S	...	E	...	G	...	Q	...	K	I	R	...	K	0
C	S	...	...	...	G	...	Q	...	K	I	R	...	K	0
O	S	...	...	...	G	...	...	H	...	I	...	...	K	0
P	S	F	...	D	G	K	N	H	K	I	R	...	K	0
BR1	...	...	E	...	G	...	...	...	K	I	R	...	...	34.8
BR2	...	...	...	...	G	...	...	H	...	...	...	...	K	23.9
BR3	...	...	...	...	G	K	N	H	...	...	R	...	K	15.2
BR4	S	...	E	...	G	K	N	...	K	I	R	...	K	10.9
BR5	S	...	...	...	G	K	N	H	...	I	...	...	K	8.7
BR6	...	...	...	...	G	...	...	...	K	I	R	...	...	2.2
BR7	S	...	E	...	G	...	...	...	K	I	R	...	K	2.2
BR8	...	...	...	...	G	K	...	H	...	...	R	...	...	2.2

Abbreviation: PvDBP, *Plasmodium vivax* Duffy binding protein.

<sup>a</sup> Ellipses indicate identity with the Sal I sequence. Sal I, AH, C, O, and P are PvDBP haplotypes expressed as recombinant antigens for antibody detection in this study; BR1–BR8 are the PvDBP haplotypes found in the *P. vivax* population of the study site.



**Figure 2.** Temporal variation in *Plasmodium vivax* prevalence and levels of immunoglobulin (Ig) G antibodies to *P. vivax* Duffy binding protein (PvDBP) Sal I and the C-terminal, 19-kDa region of *P. vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1<sub>19</sub>) in rural Amazonians. *Top panel*, Prevalence of *P. vivax* parasitemia detected with microscopy and/or quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in 7 consecutive cross-sectional surveys in March–May 2010 (baseline), May–July 2010, March–April 2011, October–November 2011, April–May 2012, October–November 2012, and April–May 2013 (solid line); dashed lines represent 95% confidence intervals. *Middle and bottom panels*, Median reactivity indices of IgG antibodies to PvDBP Sal I (middle) and PvMSP-1<sub>19</sub> (bottom), detected with a multiplex assay during the same cross-sectional surveys (solid lines); dashed lines represent interquartile ranges. Data for other PvDBP variants and merozoite surface protein antigens are shown in Supplementary Figure 2.

#### Antibody Levels and Prospective Risk of Clinical Vivax Malaria

An average of 8.4 clinical vivax malaria episodes per 100 person-months at risk were recorded in the study population over the study period, with a peak of 39.3 cases per 100 person-months in October 2011 (Supplementary Figure 4). A total of 529 clinical vivax malaria episodes were recorded over the whole study period. Survival analysis showed no delay in time to the first clinical vivax malaria episode in the upper and middle tertiles of IgG response to any PvDBP variant or MSP, compared with the lower tertile of antibody response

**Table 2.** Association Between Levels of Naturally Acquired Antibodies to PvDBP and PvMSP Variants and Prospective Risk of Clinical Vivax Malaria in Rural Amazonians

Antigen	Variant	Middle vs Lower Tertile of Reactivity Indices <sup>a</sup>		Upper vs Lower Tertile of Reactivity Indices <sup>a</sup>	
		HR (95% CI) <sup>b</sup>	P Value	HR (95% CI) <sup>b</sup>	P Value
PvDBP	Sal I	1.05 (.73–1.51)	.78	1.14 (.78–1.67)	.49
	AH	0.88 (.62–1.25)	.47	0.88 (.60–1.27)	.49
	C	0.91 (.64–1.29)	.60	0.97 (.67–1.40)	.89
	O	0.83 (.59–1.16)	.28	0.89 (.61–1.26)	.48
	P	0.81 (.56–1.15)	.25	0.93 (.64–1.34)	.69
PvMSP-1 <sub>19</sub>	Belém	0.82 (.58–1.16)	.26	1.20 (.85–1.68)	.31
PvMSP-3 $\alpha$	Belém	1.11 (.76–1.61)	.60	1.21 (.83–1.77)	.33
PvMSP-9	Belém	0.86 (.60–1.24)	.42	1.01 (.72–1.43)	.93

Abbreviations: CI, confidence interval; HR, hazard ratio; PvDBP, *Plasmodium vivax* Duffy binding protein; *P. vivax* PvMSP, merozoite surface protein.

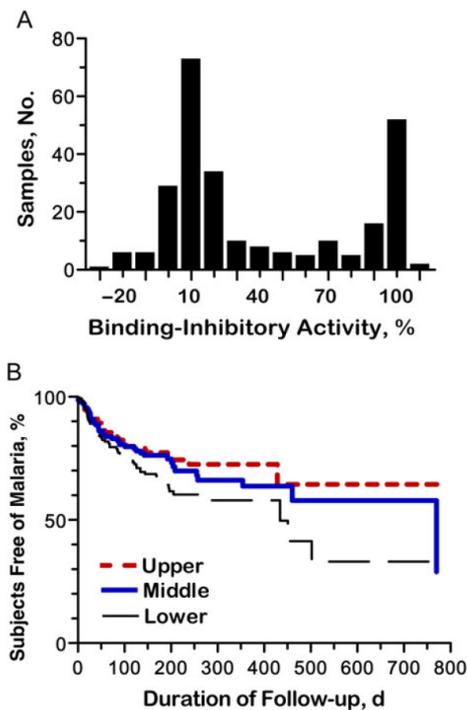
<sup>a</sup> Antibody levels were stratified into tertiles of reactivity indices for analysis.

<sup>b</sup> HRs were obtained with Cox proportional hazards models adjusted for age, sex, and genotype for the Duffy antigen/receptor for chemokines.

(Supplementary Figure 5). We compared HRs for the time to the first clinical vivax malaria episode across tertiles of specific antibody levels, using Cox proportional hazards models adjusted for age, sex, and DARC genotype, and found no significant association between levels of specific IgG antibodies and prospective risk of clinical vivax malaria (Table 2).

#### Naturally Acquired Anti-PvDBP BIABs

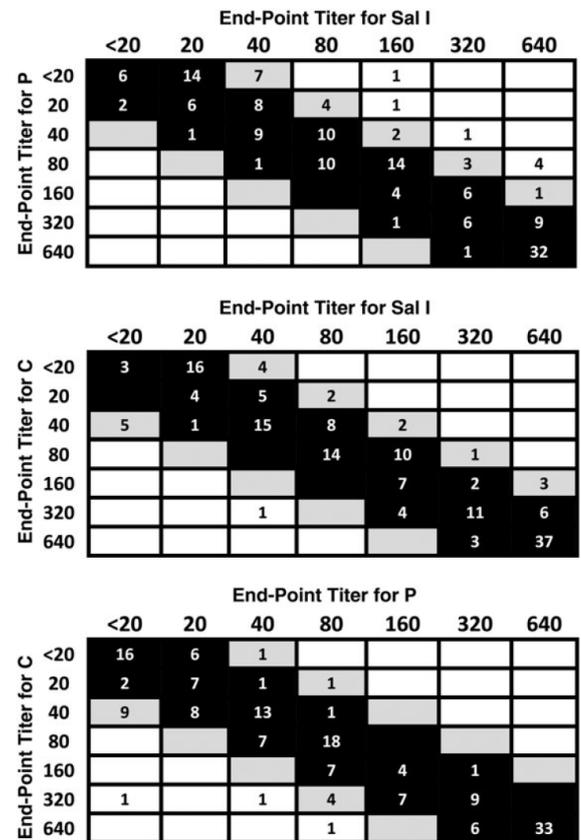
We used the Sal I variant of PvDBP to measure BIABs in 572 plasma samples from 263 subjects (1–7 samples per subject; 47.9% of subjects had  $\geq 2$  samples tested) with detectable antibody responses to PvDBP using the bead array assay. The frequency distribution of BIAB levels at subjects' enrollment was bimodal, with peaks around 0%–10% and 90%–100% inhibition (Figure 3A); 26.6% of the samples had  $>80\%$  and 20.5% had  $>90\%$  BIAB activity. BIAB levels correlated positively with levels of IgG antibodies to all PvDBP variants ( $P < .001$  for all; Supplementary Table 4). Furthermore, BIAB activity correlated weakly, but positively, with subjects' age ( $\rho = 0.247$ ;  $P = .001$ ). To examine whether high levels of binding-inhibitory activity changed over time, we chose 43 study participants with  $\geq 1$  BIAB activity measurement above 80% and analyzed their subsequent BIAB levels. Thirty subjects (69.8%) maintained their inhibitory activity at  $>80\%$  in all subsequent evaluations up to 37 months apart (total of 2–6 measurements per subject), and only 13 subjects had BIAB activity reduced to  $\leq 80\%$  during the follow-up (Supplementary Figure 6). We found no significant boosting of BIAB responses after a laboratory-confirmed *P. vivax* infection documented during follow-up (data not shown). These results indicate that, once acquired, high levels of binding-inhibitory activity usually persist for months, even in the absence of repeated exposure to the parasite.



**Figure 3.** Naturally acquired binding-inhibitory antibodies (BIABs) to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP) in rural Amazonians. BIAB activity was expressed as the percentage of inhibition of PvDBP (Sal I variant) binding to solid-phase Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) in vitro. *A*, Frequency distribution of the percentage of binding inhibition of anti-PvDBP antibodies at enrollment in 263 rural Amazonians; quite similar results were obtained with the complete data set ( $n=572$  samples). *B*, Kaplan-Meier curve showing the proportion of rural Amazonians who remained free of microscopically confirmed clinical vivax malaria during follow-up, according to their levels of anti-PvDBP BIABs. Study participants ( $n=229$ ) who were DARC positive and free of *P. vivax* infection at the time of antibody measurement were grouped into tertiles of BIAB activity (upper,  $\geq 50\%$ ; middle, 6%–49%; lower,  $<6\%$ ) and followed up for up to 37 months. The unit of analysis was the period of observation (in days) between the baseline and the next BIAB measurement, the first vivax malaria episode, or the date when subjects left the study, whichever came first. Each subject contributed between 1 and 6 periods of observation, with 456 BIAB measurements ( $n=152$  in each BIAB tertile) and 126 events (33, 39, and 54 in the upper, middle, and lower BIAB tertiles, respectively) analyzed.

#### Variant Specificity of BIABs

We used 164 plasma samples from 77 subjects with BIAB activity of  $>80\%$ , measured with the Sal I variant of PvDBP, to evaluate the variant specificity of BIABs. Plasma samples were serially diluted between 1:20 and 1:640 to compare their binding-inhibitory end-point titers with PvDBP variants Sal I, C, and P, using the same functional assay. The vast majority (82.9%–89.0%) of plasma samples had similar binding-inhibitory activity against each variant ( $\leq 2$ -fold difference in pairwise comparisons of end-point titers; Figure 4), despite the substantial divergence in their domain II sequences (Table 1). Some (9.1%–16.5%) had moderately variant-specific BIABs, with a 4-fold difference in end-point titer to pairs of variants, while



**Figure 4.** Pairwise comparisons of binding-inhibitory antibody (BIAB) end-point titers to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein variants in rural Amazonians. *Top panel*, Sal I variant (columns) versus P variant (rows). *Middle panel*, Sal I variant (columns) versus C variant (rows). *Bottom panel*, P variant (columns) versus C variant (rows). Black boxes indicate comparisons with a  $\leq 2$ -fold difference in end-point titer between variants (“variant-transcending” BIABs); gray boxes, comparisons with a 4-fold difference in end-point titer (“moderately variant-specific” BIABs); and white boxes, comparisons with a  $>4$ -fold difference in end-point titer (“variant-specific” BIABs). Numbers of samples with each end-point titer are indicated within boxes; results for 164 plasma samples from 77 subjects (1–7 samples per study participant) are analyzed.

few samples (0.6%–4.3%) had highly variant-specific BIABs with  $>4$ -fold difference in end-point titer (Figure 4). These data indicate that, once acquired, high levels of binding-inhibitory activity for anti-PvDBP antibodies are mostly variant transcending.

#### BIABs and Prospective Risk of Clinical Vivax Malaria

We next tested whether strong BIAB responses protected from clinical malaria. To this end, we grouped study participants into tertiles of BIAB response. Survival analysis showed a delay in time to the first clinical vivax malaria episode among subjects in the upper and middle tertiles of BIAB response, compared with their counterparts in the lower tertile (Figure 3B). A Cox

**Table 3. Association Between Binding-Inhibitory Activity of Naturally Acquired Antibodies to PvDBP and Prospective Risk of Clinical Vivax Malaria in Rural Amazonians**

Cox Model	Middle vs Lower Tercile of BIAb Responses <sup>a</sup>		Upper vs Lower Tercile of BIAb Responses <sup>a</sup>	
	HR (95% CI) <sup>b</sup>	P Value	HR (95% CI) <sup>b</sup>	P Value
Unadjusted	0.59 (.39–.90)	.01	0.51 (.33–.79)	.003
Adjusted for age	0.62 (.41–.94)	.02	0.59 (.38–.93)	.02
Adjusted for sex	0.57 (.43–.97)	.04	0.48 (.37–.86)	.008
Adjusted for DARC genotype	0.56 (.37–.86)	.008	0.54 (.34–.84)	.007
Adjusted for all variables above	0.58 (.38–.89)	.01	0.59 (.37–.93)	.02

Abbreviations: BIAb, binding-inhibitory antibody; CI, confidence interval; DARC, Duffy antigen/receptor for chemokines; HR, hazard ratio; PvDBP, *Plasmodium vivax* Duffy binding protein.

<sup>a</sup> Antibody responses were stratified into tertiles of the percentage of binding inhibition: upper ( $\geq 50\%$ ), middle (6%–49%), and lower (<6%).

<sup>b</sup> HRs were obtained with Cox proportional hazards models.

proportional hazards model adjusted for age, sex, and DARC genotype showed a 41%–42% reduction in the prospective risk of clinical malaria among subjects in the upper and middle tertiles of BIAb response at baseline, relative to those in the lower tertile (Table 3). Age (in years) was another independent predictor of reduced risk of clinical vivax malaria in the fully adjusted Cox model (HR, 0.98; 95% CI, .97–1.00;  $P = .005$ ), suggesting that age-related factors other than BIABs are also associated with protection. Female sex (HR, 1.45; 95% CI, 1.01–2.08;  $P = .04$ ) was independently associated with an increased risk of malaria, after adjustment for BIAb response, but we have no clear-cut explanation for this finding. Interestingly, the Cox model revealed no significant interaction between DARC genotype and BIAb response ( $P$  values between .27 and .98) in their association with the outcome, despite the recent finding of greater in vitro binding-inhibitory activity of anti-PvDBP antibodies with Fy<sup>a</sup> RBCs, compared with Fy<sup>b</sup> RBCs [23].

## DISCUSSION

This cohort study provides the first evidence that naturally acquired anti-PvDBP BIAb responses are associated with reduced risk of clinical vivax malaria. Of note, high BIAB responses developed under conditions of low malaria endemicity that are typical of rural Amazonian communities and, once acquired, were predominantly variant transcending and long lasting. Moreover, the protective effect of anti-PvDBP BIABs was not modulated by hosts' DARC genotype. These results further support PvDBP as the most promising vaccine target for *P. vivax* blood stages.

Only 8.7% of children aged 5–14 years and exposed to very intense malaria transmission in Papua New Guinea have been found to acquire BIABs with >90% inhibitory activity [9].

Interestingly, these children with high levels of BIABs at baseline had a reduced risk of *P. vivax* malaria diagnosed by means of conventional microscopy over the next 25 weeks, compared with those with <50% inhibitory activity, although no protection was observed against *P. vivax* infections diagnosed with a more sensitive molecular method. Moreover, these children, once infected, had comparatively reduced *P. vivax* densities [9]. These results indicate that high levels of BIABs in hyperendemic settings are associated with reduced parasite growth, often resulting in low-density *P. vivax* infections that are missed by conventional microscopy, rather than fully sterilizing immunity. This previous study was unable to examine the association of high levels of BIABs with protection against clinical immunity because by age 5 years almost all the children in this population were immune to *P. vivax* illness.

Our data underline the need for functional assays to detect anti-PvDBP antibodies mediating protective immunity, rather than antibodies that are markers of increased exposure to infection [24]. We found no association between high total IgG responses to PvDBP and clinical immunity to malaria in rural Amazonians, suggesting that our conventional serology measures both protective and nonprotective antibodies. Whether BIABs target mostly polymorphic or conserved epitopes of PvDBP domain II remains to be determined, but our titration experiments with different PvDBP variants suggest that most strongly inhibitory antibodies are variant transcending. To better analyze the fine specificity of naturally acquired BIABs, we are currently generating a panel of human monoclonal antibodies, from rural Amazonians whose anti-PvDBP antibodies have high and long-lasting binding-inhibitory activity, for use in epitope mapping and further functional characterization of these potentially protective responses.

Given our inability to distinguish protective from nonprotective antibodies by conventional serology, the absence of significant associations between IgG responses to PvMSP-1<sub>19</sub>, PvMSP-3 $\alpha$ , and PvMSP-9 and protection from clinical vivax malaria is not entirely surprising. A single cohort study of young Papua New Guinean children aged 1–3 years has shown an association between high levels of antibodies to both PvMSP-3 $\alpha$  and PvMSP-9 and reduced incidence of clinical vivax malaria over 16 months of follow-up [25]. Of note, no association between antibody responses to PvMSP-1<sub>19</sub> and reduced risk of *P. vivax* infection [8, 26, 27] or high-density parasitemia [8, 27] has been found in cohort studies so far. In contrast, the association between anti-PfMSP-1<sub>19</sub> antibodies and protection from *P. falciparum* malaria has been well demonstrated in Africa and Papua New Guinea [28].

We conclude that high titers of long-lasting BIABs develop and can confer broadly specific clinical immunity to *P. vivax* under conditions of low malaria transmission, with clear implications for the development of PvDBP-based vaccines. As shown elsewhere [29], repeated exposure to the parasite is not

necessarily required to maintain strong BIAb responses, once they develop. Moreover, BIABs seem to protect against several PvDBP variants, putatively because they target conserved, rather than variant-specific epitopes [24]. Therefore, a PvDBP vaccine that elicits antibody responses with these properties is very likely to be successful in preventing *P. vivax* infection and clinical disease.

### Supplementary Data

Supplementary materials are available at <http://jid.oxfordjournals.org>. Consisting of data provided by the author to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the author, so questions or comments should be addressed to the author.

### Notes

**Acknowledgments.** We thank all inhabitants in Remansinho for their enthusiastic participation in this study; Amanda B. Gozde, Pablo S. Fontoura, Kézia Katiani G. Scopel, Nathália F. Lima, Carlos E. Cavasini, Raquel M. Gonçalves, Maria José Menezes, Rosely S. Malafrente, Camilla L. Batista, Ariel M. Silber, Cristiana F. Alves de Brito, Mônica da Silva-Nunes, Carla Roberta O. Carvalho, and Mauro R. Tucci for the help in field work and clinical care of patients; Cleide F. Nunes and Eusueli Araes da Silva for microscopic diagnosis of malaria; Márcio C. Santana, Andrecreusa N. Duarte, and Francisco Naidlo C. Leitão for overall logistic support; and Lenore Carias for laboratory support.

**Disclaimer.** The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Financial support.** This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (International Centers of Excellence in Malaria Research program; research grants U19 AI089681 to Joseph M. Vinetz, U19 AI089686 to James W. Kazura, and AI064478 to C. L. K.); the Veterans Administration Research Service (C. L. K.), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (grants 2009/52729-9 to M. U. F. and 2013/23770-6 to S. B.), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of Brazil (scholarship to V. C. N. and senior researcher scholarship to M. U. F.).

**Potential conflicts of interest.** All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

### References

- Longley RJ, Sattabongkot J, Mueller I. 2016. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology* **2016**; 143:154–70.
- Lin E, Kiniboro B, Gray L, et al. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. *PLoS One* **2010**; 5:e9047.
- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* **2002**; 66: 641–8.
- da Silva-Nunes M, Codeço CT, Malafrente RS, et al. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg* **2008**; 79:624–35.
- Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **2009**; 80:452–9.
- Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, et al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* **1993**; 261:1182–4.
- Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Pujalon O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol* **2013**; 81:27–76.
- Cole-Tobian JL, Michon P, Biasor M, et al. Strain-specific Duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous *Plasmodium vivax* strains in Papua New Guinean children. *Infect Immun* **2009**; 77:4009–17.
- King CL, Michon P, Shakri AR, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105:8363–8.
- Grimberg BT, Udomsangpet R, Xainli J, et al. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med* **2007**; 4:e337.
- Barbosa S, Gozde AB, Lima NF, et al. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**; 8:e3109.
- Gonçalves RM, Scopel KK, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PLoS One* **2012**; 7:e44394.
- Ministry of Health of Brazil. Practical guidelines for malaria therapy [in Portuguese]. Ministry of Health of Brazil, **2010**. [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_pratico\\_malaria.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf). Accessed 30 May 2016.
- Kempińska-Podhorodecka A, Knap O, Drozd A, et al. Analysis for genotyping Duffy blood group in inhabitants of Sudan, the fourth cataract of the Nile. *Malar J* **2012**; 11:115.
- Singh S, Pandey K, Chattopadhyay R, et al. Biochemical, biophysical, and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *J Biol Chem* **2001**; 276:17111–6.
- Lima-Junior JC, Jiang J, Rodrigues-da-Silva RN, et al. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 $\alpha$  (PvMSP-3 $\alpha$ ) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. *Vaccine* **2011**; 29:1801–11.
- Lima-Junior JC, Tran TM, Meyer EV, 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.
- Dent AE, Malhotra I, Wang X, et al. Contrasting patterns of serologic and functional antibody dynamics to *Plasmodium falciparum* antigens in a Kenyan birth cohort. *Clin Vaccine Immunol* **2015**; 23:104–16.
- Shakri AR, Rizvi MM, Chitnis CE. Development of quantitative receptor-ligand binding assay for use as a tool to estimate immune responses against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein region II. *J Immunoassay Immunochem* **2012**; 33:403–13.
- Sousa TN, Cerávolo IP, Fernandes Fontes CJ, Couto A, Carvalho LH, Brito CF. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Mol Biochem Parasitol* **2006**; 146:251–4.
- Vaida F, Xu R. Proportional hazards model with random effects. *Stat Med* **2000**; 19:3309–24.
- Batista CL, Barbosa S, da-Silva Bastos M, Viana SA, Ferreira MU. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: a community-based study in rural Amazonia. *Parasitology* **2015**; 142:374–84.
- King CL, Adams JH, Xianli J, et al. Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup> antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**; 108:20113–8.
- Ntumngia FB, King CL, Adams JH. Finding the sweet spots of inhibition: understanding the targets of a functional antibody against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Int J Parasitol* **2012**; 42:1055–62.
- Stanisic DI, Javati S, Kiniboro B, et al. Naturally acquired immune responses to *P. vivax* merozoite surface protein 3 $\alpha$  and merozoite surface protein 9 are associated with reduced risk of *P. vivax* malaria in young Papua New Guinean children. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**; 7:e2498.
- Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, et al. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun* **2006**; 74:2726–33.
- Cutts JC, Powell R, Agius PA, Beeson JG, Simpson JA, Fowkes FJ. Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* **2014**; 12:150.
- Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* **2010**; 7:e1000218.
- Souza-Silva FA, da Silva-Nunes M, Sanchez BA, et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* **2010**; 82:185–93.