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

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 sobrevida 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 baseados 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⁺ 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.

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 Mauritânia (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 Américas), 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 consequentemente 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-morbididades 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 politransfudido 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 a 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 carboxi-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^{ES} [ES= eritrócito silencioso]) e *FY**X (ou *FY**b^{fraco}), que expressam os respectivos antígenos: *Fy*^a, *Fy*^b, *Fy* e uma pequena quantidade de *Fyb* (*Fyb*^{fraco}). Portanto, os seres humanos podem apresentar as seguintes combinações de alelos: *Fy*^a*Fy*^a, *Fy*^b*Fy*^b (homozigotos), *Fy*^a*Fy*, *Fy*^b*Fy* (heterozigotos com um único alelo expresso), *Fy*^a*Fy*^b (heterozigotos com dois alelos expressos), *FyFy* (Duffy negativos) ou ainda diferentes combinações com *Fyb*^{fraco}.

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*^b 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^{nulo} ou *FY**B^{ES}.

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*^b, 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 predomínio 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^{ES}). 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^{ES} 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^{ES}FY*B^{ES}) 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^{ES}FY*B^{ES} 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^{ES} 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^{ES} 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^a e aumento, de acordo com uma maior expressão de Fy^b. 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^{ES} 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^{nulo} foi evidente a redução no risco de infecção estágio sanguínea por *P. vivax* associado a presença de um alelo FY*A^{nulo}, em relação a FY*AFY*A. Em crianças abaixo de 15 anos, a parasitemia foi quatro vezes mais baixa entre FY*AFY*A^{nulo} 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 μm), 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 consequentemente, 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; DURASINGH, 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 róptrias 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-1₁₉ (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-1₈₃), dois fragmentos internos de 30 e 38 kDa (MSP-1₃₀ e MSP-1₃₈) e um fragmento C-terminal de 42 kDa (MSP-1₄₂) (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-1₄₂ em 2 fragmentos: um N-terminal com 33 kDa (MSP-1₃₃) e um C-terminal de 19kDa (MSP-1₁₉) (HACKETT et al., 1999; HARRIS et al., 2005). Como consequência disso, MSP-1₃₃ é liberada na circulação, enquanto que MSP-1₁₉ 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-1₁₉ 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-1₁₉, 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-1₁₉ 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-1₈₃ 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-1₁₉. 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-1₁₉ 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-1₁₉, 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-1₁₉, 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-1₁₉ 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: *pvmSP3- α* , *pvmSP3- β* e *pvmSP3*. Cada um desses genes *pvmSP3* codifica uma proteína com domínio central rico em alanina, com predição para formar estrutura secundária de forma α -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 *pvmSP3* 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 *mSP3* de *P. falciparum*, também no cromossomo 10 e com dois genes *mSP3* em *P. knowlesi*, localizados em diferentes cromossomos. Entre os produtos desses genes de *P. vivax*, destacam-se MSP-3 α , MSP-3 β e MSP-3 γ , 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 α e PvMSP-3 β , estão presentes na superfície dos merozoítos dentro de esquizontes maduros, ainda em células sanguíneas infectadas. PvMSP-3 α 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 α 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 α 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 β 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 α , MSP-3 β 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 α 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 α* : 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 α , 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 α e 79,1% anti-PvMSP-3 β . Já Mourão et al. (2012), empregando uma proteína recombinante PvMSP-3 α 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 α , enquanto que 88,9% contra a imunogênica PvMSP-1₁₉. Para ambas as proteínas utilizadas nesse estudo, as magnitudes de respostas de anticorpos IgG tendem a ser baixas em indivíduos em primo-infecção, 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-1₁₉ 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_{E795-A808}). Respostas de anticorpos contra a variante PvMSP-9 RIRII, que contém os Blocos I e II da região C-terminal (e consequente 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_{E795-A808}, 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_{E795-A808}. 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 α , β e γ) e também está envolvida no processo de invasão eritrocitário nessa espécie (embora apenas PkDBP α 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 DBP-II, círculos brancos, não-ligação a DBP-II.

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 α . Entretanto, Batchelor et al. (2014) através da cristalização da região II de PvDBP (PvDBP-II) em contato com DARC, não revelou nenhum contato entre PvDBP-II 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 PvDBP-II, 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 consequentemente falha na formação do heterotrímero 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_{II} 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^{ES}, mostraram significativa redução de ligação quando comparado com FY*A em homozigose. Hemácias FY*B^{ES}FY*B^{ES}, como esperado, não apresentaram ligação com o parasito. Nesse mesmo estudo, foram encontrados que anticorpos anti-PvDBP inibem mais eficientemente a ligação entre PvDBP_{II} 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), Mauritânia (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

Mauritânia 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 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 contêm 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.

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.

REFERÊNCIAS¹

- 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.

¹ 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.; DURASINGH, 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.

GOLENDA, 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.; ROOBSOONG, 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.; TRAICOFF, 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.; PATTNAIK, 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. 1873–188, 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.

KOEPLI, 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 *Plasmodium 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 α (PvMSP-3 α) 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 darling* 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. Acesso 29 Jun 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, 2010. Disponível em: http://bvsmms.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-1₁₉ and PvMSP-3 α ₃₅₉₋₇₉₈ 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 . 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.; DURASINGH, 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.; MALAFRONTA, 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 α 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.