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

Avaliação das células B de memória na malária por *Plasmodium vivax*: contribuição no entendimento da imunidade humoral de longa duração

por

Barbara Andreza Soares Lima

Belo Horizonte
2017

BARBARA ANDREZA SOARES LIMA

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS B DE MEMÓRIA NA MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*: CONTRIBUIÇÃO NO ENTENDIMENTO DA IMUNIDADE HUMORAL DE LONGA DURAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências – área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Drª. Flora Satiko Kano

Coorientação: Drª. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte

2017

Catalogação-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

L732a Lima, Barbara Andreza Soares.

2017

Avaliação das células B de memória na malária por *Plasmodium vivax*: contribuição no entendimento da imunidade humoral de longa duração / Barbara Andreza Soares Lima. – Belo Horizonte, 2017.

XV, 73 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 75 - 85

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infeciosas e Parasitárias.

1. Malária vivax/genética 2. *Plasmodium vivax* /genética 3. Linfócitos B/imunologia 4. Sistema do Grupo Sanguíneo Duffy/uso terapêutico I. Título. II. Kano, Flora Satiko (Orientação). III. Carvalho, Luzia Helena (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

BARBARA ANDREZA SOARES LIMA

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS B DE MEMÓRIA NA MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*: CONTRIBUIÇÃO NO ENTENDIMENTO DA IMUNIDADE HUMORAL DE LONGA DURAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências – área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Banca examinadora:

Prof. Drª. Flora Satiko Kano (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente
Prof. Drª. Lílian Lacerda Bueno (UFMG) Titular
Prof. Drª. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (CPqRR/FIOCRUZ) Titular
Prof. Drª. Soraya Torres Gaze Jangola (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 22/02/2017

Aos que sofrem, ou um dia sofreram, com malária

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, afinal, por mais árdua que seja a luta e por mais difícil que seja a caminhada, existe sempre uma maneira de vencer, a fé;

À Dra. Flora, por acreditar em mim. Muito obrigada pela oportunidade, por me auxiliar em cada passo do meu amadurecimento profissional. Obrigada por sempre estar presente. Obrigada por sempre me dar a oportunidade de argumentar, discutir, e poder sempre aprender com isso;

À Dra. Luzia, pela confiança, pelos conselhos e também por todas as oportunidades;

Aos demais professores do curso, pelos ensinamentos;

À Plataforma de Citometria, pelo fornecimento da infraestrutura. Em especial, à Tiza, pela disposição e auxílio nos experimentos;

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade;

À Biblioteca do CPqRR, pelo acesso gratuito à informação técnico-científica, sustentada por recursos públicos federais;

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Em especial, à CAPES pelo fornecimento da minha bolsa de mestrado e às demais agências CNPq, FAPEMIG e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do CPqRR/FIOCRUZ, pela infraestrutura e recursos.

A todos os habitantes de Sousa, que com sua boa vontade e simpatia tornaram esse estudo possível. E aqueles de Rio Pardo, os quais eu agradeço por nunca deixarem de colaborar e acreditar em nosso trabalho;

Aos meus pais, meus maiores exemplos de vida. Por todos os momentos que me incentivaram a ser uma pessoa melhor e a correr atrás do que eu sonho, sempre me fazendo acreditar que, por mais árduo que seja o caminho, no final, tudo sempre dará certo!

Ao Juninho, meu irmão, meu melhor amigo e sem dúvida aquele que me ensina a trabalhar melhor minha paciência. A sua confiança e seu senso de justiça sempre me inspiraram;

À minha família, vocês são meu alicerce!

À Ana Cristina, que me tornou com muita alegria, parte da sua família espiritual;

Aos meus amigos, por me fazerem compreender que amizades verdadeiras permanecem mesmo quando seguimos caminhos diferentes;

Aos amigos da pós-graduação, sempre dispostos a ajudar;

À minha amiga Jéssica, pela confiança, pelos conselhos, por toda ajuda e por ter dividido comigo uma longa caminhada e sem dúvida por tê-la tornado mais leve e alegre;

A Letícia, Dani e Daniel, por todos os momentos que compartilhamos não só as alegrias, mas também as tristezas. Obrigada por toda a paciência e dedicação. Vocês são muito especiais!

Aos amigos, que são muito mais que colegas de profissão, particularmente, Raianna, Michele, Mica e Marina. Aos integrantes do Laboratório de Malária que foram importantes nesta jornada. Vocês me ensinaram mais do que podem imaginar! Muito obrigada!

À Ana Luiza, que iniciou esse trabalho tão querido e me deu a oportunidade de continuá-lo;

À Camila, sempre tão prestativa. Você foi indispensável nessa reta final;

À Ruth, por sua curiosidade, disponibilidade, responsabilidade e sobre tudo, sinceridade;

Ao Pedro, por sempre me ouvir, por todos os ensinamentos, confiança e por toda a paciência. Muito obrigada!

Serendipity

(Horace Walpole)

RESUMO

A invasão dos eritrócitos pelo parasito da malária garante o estabelecimento da infecção e é responsável pelos sintomas clínicos da doença. Dessa forma, existe um grande interesse no desenvolvimento de vacinas que possam induzir a produção de anticorpos com capacidade de bloquear a invasão dos eritrócitos e consequentemente interromper o ciclo biológico do parasito. No caso do *Plasmodium vivax*, a invasão do eritrócito é altamente dependente de uma proteína do complexo apical do parasito -- *Duffy binding protein* II (DBPII) -- que reconhece o antígeno de grupo sanguíneo *Duffy* -- DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*) -- na superfície dos reticulócitos humanos. Embora a importância dos anticorpos na imunidade contra a malária esteja bem estabelecida, os fatores que estão diretamente envolvidos no mecanismo de desenvolvimento de células B de memória (MBCs) de longa duração são pouco conhecidos, o que faz-se necessário o conhecimento, especialmente para o desenvolvimento de uma vacina contra essa doença. No presente trabalho avaliamos a resposta imune adquirida contra o *P. vivax* em uma população exposta uma única vez a esse parasito em um surto ocorrido na região metropolitana de Minas Gerais, após 12 anos da infecção. A persistência de anticorpos contra as proteínas de fase sanguínea de *P. vivax* (MSP1-19 e DBPII), além dos protótipos vacinais baseados em DBPII (DEKnull e DEKnull2) foram avaliados por sorologia convencional (ELISA). Foram avaliadas também, células B de memória (MBCs) específicas diferenciadas em células secretoras de anticorpos (ASCs) IgG+ e IgM+ foram avaliadas pelo ensaio de ELISpot. Além disso, no presente trabalho foram avaliadas as MBCs circulantes e anticorpos anti- *P. vivax* (MSP1-19, variantes e protótipos vacinais de DBPII) em residentes de área endêmica, com infecção aguda e não-aguda. Os resultados mostram que, embora os anticorpos produzidos após uma única e curta exposição ao *P. vivax* são de curta duração, uma vez que, anticorpos específicos não foram observados para nenhuma das proteínas avaliadas nesse trabalho após 12 anos da ocorrência do surto, as MBCs específicas aos antígenos de *P. vivax* ainda são detectadas. De forma interessante, o protótipo DEKnull2 apresentou alta imunogenicidade com 52% de produção de ASCs IgG+ em indivíduos expostos ao surto. Além disso, observamos que a resposta de MBCs IgM+ específica para DBPII e DEKnull2 foi mais robusta que a encontrada para MBCs IgG+. Com relação aos indivíduos de área endêmica podemos observar que o acúmulo de exposição ao *P. vivax* leva a expansão de MBCs atípicas. Este trabalho permitiu observar que uma única exposição ao *P. vivax* é capaz de induzir a produção de MBCs de longa duração contra a DBPII e seus protótipos, e que apenas a exposição contínua a esse parasito é capaz de levar ao aumento das MBCs atípicas.

Palavras chave: *Plasmodium vivax*; Células B de memória; DBPII

ABSTRACT

The invasion of erythrocytes by human malaria parasites ensures the infection success and, consequently, the development of clinical disease. Thus, there is a great interest in the development of vaccines that can induce antibodies able to block parasite invasion. For *Plasmodium vivax*, only pathway known that *P. vivax* invade reticulocyte involved interaction between Duffy binding protein II (DBPII) -- the main vaccine candidate -- and the *Duffy Antigen Receptor for Chemokines* (DRAC) on reticulocyte surface. Although the importance of antibodies in the malaria immunity is established, it is not clear which factors are involved in generation of long-term memory B. Here, we investigated antibodies (Ab) and antigen-specific memory B cells (MBCs) response in individuals of vivax malaria small outbreak after 12 years. In that time, the individuals were exposure to the single and brief *P. vivax* infection in the small village closed to Belo Horizonte, a non-endemic area from Brazil. The persistence of Ab against *P. vivax* proteins (MSP1-19 and DBPII), and synthetic DBPII (DEKnull and DEKnull2) were evaluated by ELISA. Evaluation of DBPII-specific MBCs IgG+ and IgM+ responses were also performed by an optimized B-cell ELISpot assay. In addition, MBCs and Ab response against MSP1-19 and DBPII were evaluated in individuals with malaria and no malaria infection from an endemic area in Brazil. The results show that although Ab response to *P. vivax* antigens were short-lived because antibody levels did not detected 12-years after a single and brief *P. vivax* exposure, MBC specific to *P. vivax* antigens were detected, suggesting MBCs are long-lived cells. Interestingly, DEKnull2 shows high immunogenity, and 52% of individuals exposed to *P. vivax* showed specific Antibody Secreting Cells (ASCs) IgG+ response. Moreover, DBPII and DEKnull2 –specific MBC IgM+ responses were more robust than MBCs IgG+. Regarding to individuals from malaria endemic area, we found expansion of atypical MBCs. In conclusion, our results show that specific MBC to DBPII are maintained for at least 12 years, longer than the cognate serum Ab, including no re-exposure group. Moreover, only in individuals with continuous malaria exposure expanded atypical MBCs. These results are highly encouraging for vaccine developers, since reinforce the hypothesis that vaccine based on DBPII should induce long-lasting protection against vivax malaria.

Key words: *Plasmodium vivax;* Memory B cells; DBPII

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da região metropolitana de Belo Horizonte indicando a localização do distrito de Sousa, município de Rio Manso, MG 34

Figura 2. Mapa do estado do Amazonas, indicando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, AM, e a cidade de Manaus, a capital do estado 35

Figura 3. Resposta de anticorpos aos antígenos de forma sanguínea de *P. vivax* (MSP1-19, DBPII Sal-I, DBPII BR-1, DEKnull e DEKnull2) de indivíduos diagnosticado com malária no surto autóctone ocorrido no distrito de Sousa, região metropolitana de Belo Horizonte 46

Figura 4. Resposta de células B de memória do tipo IgG antígeno específica em indivíduos expostos ao surto de malária ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Distrito de Sousa, Rio Manso, MG, 2003) 49

Figura 5. Resposta de células B de memória do tipo IgM antígeno específica em indivíduos expostos ao surto de malária ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Distrito de Sousa, Rio Manso, MG, 2003) 52

Figura 6. Resposta individual de células B antígeno-específicas nos indivíduos dos grupos não exposto (caso, não-caso) e não-exposto 55

Figura 7. Estratégia de análise utilizada na imunofenotipagem de subpopulações de células B (CD19+). 57

Figura 8. Subpopulações de células B em indivíduos expostos e não-expostos ao *P. vivax*. 58

Figura 9. Análise fenotípica de subpopulações de células B em indivíduos não-expostos (n=14) e expostos ao *P. vivax* infectados e não infectados. 61

Figura 10. Resposta anticorpos para os antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* em residentes de área endêmica para malária (Rio Pardo- AM) 63

Figura 11. Análise fenotípica de subpopulações de células B em indivíduos não respondedores e respondedores aos antígenos de *P. vivax* expostos à malária. 65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista de anticorpos utilizados para citometria de fluxo 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção de ASCs antígeno- específicas para o antígeno de Febre Amarela, as proteínas MSP1-19, variantes DBPII e seus protótipos vacinais em relação ao total de ASCs IgG+ 51

Tabela 2. Proporção de ASCs antígeno-específicas para DBPII e seu protótipo DEKnull2 em relação ao total de ASCs IgM+ 53

Tabela 3. Características epidemiológicas e demográficas da população de área endêmica estudada. 60

Sumário

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Situação atual da Malária 16
1.2 Agente etiológico e ciclo biológico 18
1.3 Resposta imune humoral naturalmente adquirida contra malária 20
1.4 Proteínas de estágios sanguíneos candidatas à vacina contra o *P. vivax* 24
1.4.1. Duffy Binding Protein (DBP) de *P. vivax* 26
1.4.2 Protótipos vacinais da DBPII – DEKnull e DEKnull2 28
1.4.3 Proteína de Superfície do Merozoíto (MSP1-19) de *P. vivax* 29
2 JUSTIFICATIVA 30
3 OBJETIVO 32
3.1 Objetivos específicos 32
4 METODOLOGIA 33
4.1 Área de estudo 33
4.1.1 Área de transmissão autóctone - extra-Amazônica 33
4.1.2. Área de transmissão endêmica - região Amazônica 34
4.2 Voluntários e coleta de sangue 36
4.2.1. Área de transmissão autóctone 36
4.2.2. Área de transmissão endêmica 37
4.3 Processamento das amostras de sangue: obtenção de plasma e das células mononucleares do sangue periférico (peripheral blood mononuclear cell – PBMC) 38
4.4 Proteínas recombinantes 39
4.4.1 Duffy binding protein de *P. vivax* (DBPII) e seus protótipos vacinais (DEKnull e DEKnull2) 39
4.4.2 Proteína de superfície do merozoíto 1 de *P. vivax* (MSP1-19) 39
4.4.4 Antígeno da Febre Amarela 40
4.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG contra DBPII (Sal-I e BR-1), DEKnull, DEKnull2 e MSP1-19 40
4.6 Cultura das PBMCs e ativação policlonal das células B de memória circulantes 41
4.7 Ensaio imunoenzimático (ELISpot) para detecção de células B secretoras de anticorpos IgG e IgM específicos para DBPII Sal-I, DBPII BR-1, MSP1-19 DEKnull, DEKnull2 e Febre amarela 41
4.8. Avaliação fenotípica de subpopulações de células B e estratégia de análise 43
5 RESULTADOS 45
5.1 Área transmissão autóctone - extra-Amazônica 45

5.1.2 Resposta de anticorpos IgG antígeno específicos em indivíduos expostos ao surto autóctone de *P. vivax*.....45
5.1.2 Detecção de células B de memória antígeno- específicas em indivíduos expostos ao surto autóctone de *P. vivax* 47
5.1.3 Imunofenotipagem de PBMCs de indivíduos expostos ao Surto de malária .56
5.2. Área de Transmissão Endêmica 59
5.2.1. Avaliação das subpopulações de células B em indivíduos de área endêmica para malária 59
5.2.2. Resposta de anticorpos IgG total para as proteínas de formas sanguíneas de *P. vivax* e a associação com subpopulações de células B em indivíduos de área endêmica para malária 62
6 DISCUSSÃO.....66
6.1 Exposição única ao *P. vivax* induz resposta de células B de memória de longa duração 66
6. 2 Exposição contínua à malária induz alteração no balanço de células B, mas não altera a resposta de anticorpos 71
7 CONCLUSÃO 74
REFERÊNCIAS.....75
ANEXO 1- Questionário aplicado aos indivíduos participantes do estudo 86
ANEXO 2- Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes do estudo 87

1 INTRODUÇÃO

1.1Situação atual da Malária

A malária é uma das principais doenças parasitárias de ocorrência mundial e constitui um grande desafio para as autoridades em Saúde Pública. Desde o ano 2000, grandes investimentos têm sido direcionados ao combate à malária, visando o controle da doença e a redução dos números de casos registrados. De fato, entre os anos 2000 e 2015, essas medidas de controle contribuíram para a redução da morbidade e mortalidade em 41% e 62%, respectivamente (WHO, 2016). Apesar dos dados animadores, a malária continua tendo um grande impacto na saúde e na qualidade de vida das pessoas, onde ainda em 2015, foram notificados 212 milhões de casos da doença e 419 mil mortes, principalmente em crianças abaixo de cinco anos (WHO, 2016).

No continente americano, a malária é endêmica em 21 países e cerca de 108 milhões de pessoas vivem sob o risco de contrair a doença (PAHO, 2016). No Brasil, a malária é endêmica na região da Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, onde concentra 99,8% dos casos registrados no país. O perfil de transmissão na área endêmica para malária é heterogêneo, instável e a maioria da população exposta é composta por imigrantes de regiões não endêmicas para malária no Brasil (Camargo *et al.*, 1994). No entanto, o perfil da população tem mudado nos últimos anos com os programas de assentamento agrícola (De Castro *et al.*, 2006).

No Brasil, em 2015, foram notificados 143.000 casos da doença o que representa uma redução de 89% nos últimos 15 anos (Penido, 2016). A redução do número de casos de malária é reflexo principalmente da nova estratégia de controle da doença promovido pelo Ministério da Saúde, que teve como foco o controle dos casos clínicos priorizando o diagnóstico e tratamento precoce e não apenas no controle vetorial (Saúde, 2009). Contudo, a transmissão da malária continua sendo um desafio na Amazônia brasileira. Alguns fatores têm dificultado o controle da

doença como a urbanização descontrolada seguido do intenso êxodo rural, além dos fatores ambientais, que favorecem a proliferação dos mosquitos vetores e contribuem para a transmissão de malária na região. Além disso, os casos de infecção assintomática e a expansão de parasitos resistentes às drogas antimaláricas também constituem desafios no controle da malária no Brasil (Lapouble *et al.*, 2015; Ferreira e Castro, 2016).

Apesar da maior parte dos casos de malária ocorrer na região da Amazônia, casos dessa doença também ocorrem fora da área de transmissão ativa. Os casos extra-amazônicos podem ter origem nos casos de áreas endêmicas brasileiras, bem como importados do continente africano, América do Sul e de outros países que possuem transmissão ativa da doença. Nesses casos, a transmissão da doença é favorecida pela presença do mosquito vetor em todo o território nacional (Saúde, 2009; 2015a). Além disso, em regiões de Mata Atlântica, tem sido registrado casos autóctones de malária que são transmitidos principalmente pelo mosquito *Anopheles (Kerteszia) cruzii.* Dessa forma, os indivíduos que têm proximidade e contato com as áreas de Mata Atlântica são susceptíveis ao risco de contrair malária. As espécies *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* são mais comumente identificados como os causadores da doença nessas áreas. Apesar de que pouco se sabe sobre os fatores envolvidos na dinâmica da transmissão de malária nessas regiões, os trabalhos mais recentes têm sugerido que as espécies de *Plasmodium* spp que acometem os símios, poderiam estar envolvidas nos casos humanos que vêm sendo notificados (revisto em De Pina-Costa *et al.* (2014); Ferreira e Castro (2016).

Embora o número de casos de malária na região extra-amazônica seja muito menor quando comparado aos da região amazônica, a gravidade e a letalidade sempre foram maiores. Enquanto a letalidade na região amazônica decresce ao longo dos anos, na região extra-amazônica tem aumentado (Saúde, 2015b). Para exemplificar, no ano de 2014, foram registrados 559 casos de malária em toda a região extra-amazônica, sendo que 15 casos foram a óbito (Saúde, 2015a). Uma das maiores dificuldades nas áreas extra-amazônicas resultam principalmente da falta de suspeita clínica-epidemiológica nos serviços médicos, o que contribui na demora do diagnóstico e intervenção adequada em tempo hábil (Chaves, 2013).

Em Minas Gerais a transmissão da malária é baixa, contudo o estado possui fatores de risco como: presença do vetor e fluxo migratório de indivíduos infectados em áreas endêmicas. No período de 2010 a 2016 foram registrados 582 casos de malária no estado de Minas Gerais, dos quais 13 (2,23%), foram a óbito (Chaves, 2017). Focos de transmissão autóctone já foram descritos em diversas cidades do estado, como Montalvânia, Mantena, Uberlândia, Monte Alegre, Sousa (Fontes *et al.*, 1991; Limongi *et al.*, 2008; Ceravolo *et al.*, 2009; De Pina-Costa *et al.*, 2014; Lorenz *et al.*, 2015) e mais recentemente (dezembro de 2016 e Janeiro de 2017), um surto de malária ocorreu em Diamantina e no distrito de Couto Magalhães com 17 casos confirmados em garimpeiros da região (Chaves, 2017).

1.2 Agente etiológico e ciclo biológico

A malária é causada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium.* Em humanos, cinco espécies são capazes de causar a doença, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium Knowlesi* e são transmitidos pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Das espécies que causam a malária em humanos, *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes; sendo o *P. falciparum* responsável pela maioria dos casos graves registrados, enquanto que o *P. vivax* é a espécie que possui maior distribuição geográfica fora do continente Africano, representando 41% dos casos registrados em 2015 no mundo (WHO, 2016). No Brasil, 87% dos casos registrados são causados pelo *P. vivax* (Saúde, 2015a).

O ciclo biológico do *Plamodium sp.* em humanos, compreende duas fases distintas: uma no hospedeiro invertebrado, nas fêmeas de mosquitos anofelinos, e a outra no hospedeiro vertebrado, o homem (Crompton *et al.*, 2014; Meibalan e Marti, 2016). No homem, a infecção tem início quando formas infectantes, os esporozoítos, são inoculados na pele pela picada do mosquito infectado. Estima-se que, 100 esporozoítos são inoculados na pele e apenas a metade alcançará o fígado (Holz *et al.*, 2016). No fígado, os esporozoítos atravessam muitos hepatócitos até que finalmente se estabelecem em uma dessas células. No interior dos hepatócitos ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo, e os esporozoítos se diferenciam em

trofozoítos. Em seguida, após sucessivas divisões celulares, chamadas esquizogonia, ocorre a formação dos esquizontes (Holz *et al.*, 2016). Os esquizontes maduros liberam os merozoítos diretamente na corrente sanguínea por meio de brotamento de vesículas, denominadas merossomos (Sturm et al., 2006). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, uma subpopulação dos parasitos podem permanecer em estado de latência no fígado (hipnozóitos) que é responsável pelos casos de recaída (Krotoski, 1985).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos por meio de interações específicas entre as proteínas do parasito e receptores presentes na superfície dos eritrócitos (Petter e Duffy, 2015). Enquanto os merozoítos de *P. falciparum* são capazes de invadir os eritrócitos por diversas vias de invasão (revisto por Petter e Duffy (2015), o *P. vivax* tem, até o momento, uma única via de invasão conhecida, que envolve a interação entre o antígeno do grupo sanguíneo *Duffy* receptor de quimiocinas -- *Duffy antigen/chemokine receptor*, DARC -- e a proteína de micronema do parasito, *Duffy binding protein* (DBP) (Miller *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1992). Concluído o processo de invasão, o parasito se replica dentro dos eritrócitos e ocasiona a ruptura dessas células liberando milhares de novos merozoítos na corrente sanguínea que irão infectar novos eritrócitos. Nessa fase do ciclo, as moléculas geradas pelo parasito e a lise das hemácias ocasionam os sintomas clínicos observados na infecção malárica, como febre, dor de cabeça, calafrios, náusea e fraqueza.

Ainda na fase eritrocítica, após sucessivos ciclos de replicação nas células vermelhas, ocorre o desenvolvimento de formas sexuadas, os gametócitos femininos e masculinos, que são as formas infectantes para o mosquito vetor (Sinden, 1983). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito vetor ingere os gametócitos femininos e masculinos que amadurecem no intestino médio, fecundam-se formando um zigoto diplóide. Posteriormente há o desenvolvimento em oocinetos móveis e oocistos, que amadurecem e liberam esporozoítos infecciosos, que migram para as glândulas salivares, maturam-se na forma de esporozoítos infectantes e, estão prontos para serem transmitidos para o hospedeiro vertebrado, completando assim o ciclo evolutivo dos plasmódios (Crompton *et al.*, 2014; Meibalan e Marti, 2016).

1.3 Resposta imune humoral naturalmente adquirida contra malária

A maioria dos indivíduos sem contato prévio com a malária (*naïves*) em uma primo-infecção tendem a desenvolver uma doença febril. Entretanto, a forma de apresentação da doença clínica pode variar de sintomática não complicada, grave e assintomática. Essa diferença na sintomatologia da doença é influenciada por fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro humano (Struik e Riley, 2004).

Em áreas hiperendêmicas para malária, as crianças são particularmente mais susceptíveis à malária grave e moderada (Marsh e Kinyanjui 2006; Anstey *et al*., 2009). No entanto, após sucessivas exposições ao parasito da malária as crianças mais velhas e adultos tendem a desenvolver proteção clínica contra os sintomas graves da doença, sendo que a imunidade estéril raramente é alcançada (Marsh e Kinyanjui, 2006; Langhorne *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2010). Em áreas de transmissão instável de malária a doença sintomática é observada em indivíduos de todas as faixas etárias. Em ambas as condições de transmissão apresentadas, as diferenças na sintomatologia da doença são atribuídas, em grande parte, ao desenvolvimento da imunidade naturalmente adquirida contra a malária (Fowkes *et al.*, 2016).

Estudos prévios mostram que, a imunidade naturalmente adquirida contra a malária se desenvolve de forma lenta e gradativa após sucessivas infecções. Além disso, na ausência de exposição contínua ao parasito, já foi observado que o indivíduo apresenta a diminuição ou perda da imunidade clínica adquirida (Langhorne *et al.*, 2008; Ghani *et al.*, 2009; Crompton *et al.*, 2010). Esses achados indicam que o desenvolvimento da imunidade duradoura contra a malária parece ser deficiente, uma vez que, os indivíduos expostos tendem a desenvolver uma resposta de anticorpos de vida curta. Assim, a exposição contínua aos antígenos do parasito parece ser necessária não só para a geração de células de memória, mas também para a manutenção e persistência de anticorpos (Njau e Jacob, 2012).

A importância dos anticorpos na imunidade naturalmente adquirida contra a malária foi demonstrada pela transferência passiva de anticorpos de adultos imunes para crianças com malária sintomática, o que resultou na diminuição da parasitemia

e dos sintomas clínicos nessas crianças (Cohen *et al.*, 1961; Sabchareon *et al.*, 1991). Sabe-se que, na malária os anticorpos produzidos são direcionados principalmente contra as proteínas da fase eritrocítica do parasito, onde eles podem contribuir de diversas maneiras, como por exemplo: no bloqueio da invasão dos merozoítos nas células vermelhas inibindo o seu desenvolvimento (Cohen *et al.*, 1969; O'donnell *et al.*, 2001); pode atuar em conjunto com o sistema complemento na inibição da invasão e na lise do parasito (Boyle *et al.*, 2015), ou facilitar a fagocitose do merozoíto (Hill *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014). De maneira geral, os anticorpos contra as proteínas de fase sanguínea do parasito auxiliam na redução da parasitemia e dos sintomas clínicos da doença. Porém, pouco se sabe sobre a aquisição e manutenção desses anticorpos na malária.

Alguns estudos têm mostrado que as células B de memória (MBCs) desenvolvidas contra antígenos específicos do *P. falciparum* são capazes de persistirem por muitos anos mesmo na ausência de reexposição a esse parasito, ao contrário do que é observado para os títulos de anticorpos, que tendem a cair (Migot *et al.*, 1995; Wipasa *et al.*, 2010; Ndungu *et al.*, 2012; Ndungu *et al.*, 2013). Desta forma, esses achados sugerem que a avaliação de MBCs parece ser mais apropriada na avaliação da resposta imune humoral à malária do que a detecção de anticorpos específicos. No entanto, até o momento, pouco se sabe sobre o desenvolvimento dessas MBCs e quais são os componentes da imunidade adquirida que são perdidos na ausência de exposição ao parasito da malária (Langhorne *et al.*, 2008).

O desenvolvimento e manutenção ineficiente da imunidade humoral protetora na malária, tem sido atribuída à extensa diversidade genética do parasito (Takala e Plowe, 2009), o que causa uma ampla variação clonal das proteínas expressas durante o ciclo de replicação do mesmo (Scherf *et al.*, 2008). Além disso, sugere-se que a exposição crônica ao plasmódio pode induzir a produção de MBCs funcionalmente comprometidas, que pode ocasionar uma desregulação da resposta de MBCs e contribuir para a deficiência no desenvolvimento da resposta imune humoral protetora contra os antígenos de fase eritrocítica do *Plasmodium* spp (revisto em Portugal *et al.* (2013).

De fato, células B com funções alteradas já foram bem descritas em outras infecções como hepatite C e HIV (Charles *et al.*, 2008; Moir *et al.*, 2008). Em indivíduos HIV positivo em viremia foi mostrado o aumento de MBCs com características de células hiporresponsivas ou “exaustas”. Essas MBCs expressam em sua superfície receptores com características inibitórias que parecem contribuir para uma deficiência na geração de anticorpos contra o vírus do HIV (Moir *et al.*, 2008). Uma subpopulação de células B fenotipicamente semelhante foi demonstrada em expansão em populações exposta à malária com diferentes intensidades de transmissão e são denominadas de MBCs atípicas (Weiss *et al.*, 2009; Nogaro *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2011; Portugal *et al.*, 2012; Illingworth *et al.*, 2013; Muellenbeck *et al.*, 2013).

No que se refere as MBCs atípicas, estudos já mostraram uma correlação positiva entre a expansão das MBCs atípicas e a intensidade de transmissão da malária (Weiss *et al.*, 2011). Com relação a função dessas células, um trabalho mostrou que essa subpopulação de MBCs atípicas possuem genes que codificam para a produção de anticorpos neutralizantes contra antígenos de fase sanguínea de *P. falciparum,* indicando que essas células podem estar relacionadas com a produção de anticorpos protetores contra esse parasito (Muellenbeck *et al.*, 2013). Porém a secreção desses anticorpos não foi diretamente demonstrada nesse trabalho.

Recentemente, um trabalho mostrou que o repertório de genes expressos por MBCs clássicas e atípicas são consideravelmente semelhantes, sugerindo uma estreita relação entre as duas subpopulações (Zinocker *et al.*, 2015). Contudo, já foi mostrado que o repertório de genes presentes nas MBCs atípicas é diferente daqueles apresentados pelas MBCs clássicas, indicando que essas células provavelmente possuem precursores diferentes (Muellenbeck *et al.*, 2013). Dessa forma, os dados presentes da literatura ainda são controversos quanto à origem e função das MBCs atípicas. Ainda nesse contexto, trabalhos têm mostrado que a expressão de imunoglobulinas do tipo G (IgG) nas MBCs atípicas é mais baixa quando comparados com as MBCs clássicas (Requena *et al.*, 2014; Sullivan *et al.*, 2015). Foi demonstrado também que na superfície dessas MBCs atípicas há o aumento na expressão do receptor inibitório *Fc Receptor Like 5* (FcRL5) (Portugal *et*

al., 2015; Sullivan *et al.*, 2015). Em humanos, esse receptor está relacionado com a inibição da ativação das células B por meio do receptor de células B (BCR), o que evidencia assim, seu papel como inibidor da resposta imune (Haga *et al.*, 2007). Inclusive, foi mostrado que quando MBCs atípicas são estimuladas, este tipo celular não sofre diferenciação em células secretoras de anticorpos (ASCs), diferentemente como ocorre com as MBCs clássicas (Portugal *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2015). Portanto, esses resultados indicam que essas MBCs atípicas podem não contribuir diretamente para a proteção mediada por anticorpos na malária, porém, estudos adicionais precisam ser realizados para definir a real contribuição dessa subpopulação de MBCs na malária.

De forma interessante, um trabalho recente mostrou que, indivíduos expostos ao *P. falciparum* possuem populações de MBCs heterogêneas circulantes no sangue periférico (Krishnamurty *et al.*, 2016). Esse trabalho mostrou ainda, a presença de uma subpopulação de MBCs que expressam IgM (MBCs IgM+) em camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi,* onde foi observado que essas células apresentam quantidade de hipermutação somática nas cadeias V_H e V_L do BCR semelhante, sendo essa subpopulação apta a produzir anticorpos de alta afinidade com capacidade de responder de forma mais rápida a uma reexposição à MSP1-19 de *P. chabaudi* (Krishnamurty *et al.*, 2016). Contudo, a presença de MBCs IgM+ em humanos ainda requer estudos para avaliar a real contribuição deste subtipo celular no desenvolvimento de vacinas. Em relação as imunoglobulinas do tipo M (IgM), Arama *et al.* (2015) analisaram duas populações distintas do Oeste Africano expostas ao *P. falciparum* com susceptibilidade diferente à malária, resistentes e susceptíveis. Os indivíduos resistentes à malária apresentaram maior magnitude de IgM quando comparado aos susceptíveis, sugerindo papel protetor para a IgM. Além disso, sabe-se que os anticorpos IgM são mediadores importantes na lise mediada pelo complemento, o que é importante para o controle da infecção no estágio sanguíneo do parasito (Boyle *et al.*, 2015). Esses dados sugerem que a resposta de IgM desempenha papel subestimado na proteção contra a malária.

Contudo, ainda pouco se sabe sobre a aquisição e manutenção das células envolvidas na geração de anticorpos protetores na malária, e a maioria dos estudos realizados tem sido voltados para o *P. falciparum*; para o *P. vivax* poucos são os

estudos que visam entender a resposta imune naturalmente adquirida. Até o momento, um único trabalho avaliou a longevidade de MBCs e anticorpos específicos contra proteínas do *P. vivax.* Os resultados desse estudo mostraram que indivíduos residentes em área de baixa transmissão de malária, mesmo após seis anos na ausência de reinfecção, mantiveram a frequência de MBCs específicas e os níveis de anticorpos contra os antígenos de *P. vivax* estáveis (Wipasa *et al.*, 2010).

Já está bem estabelecido que a resposta de anticorpos gerada contra o *P. vivax* é alcançada após sucessivas exposições ao parasito (revisado por Longley *et al.* (2016). Os estudos imunoepidemiológicos mostram que a aquisição da imunidade naturalmente adquirida a esse parasito ocorre de forma mais rápida do que para *P. falciparum* (Phimpraphi *et al.*, 2008; Koepfli *et al.*, 2013). Essa diferença na aquisição da imunidade sugere que o desenvolvimento da resposta imunológica entre essas duas espécies é distinto. Esse fato pode ser explicado pelas diferenças biológicas existentes entre as duas espécies de *Plasmodium* (Mueller *et al.*, 2013), como a formação de hipnozoítos no ciclo pré-eritrocítico do *P. vivax,* que pode ser responsável por gerar um *booster* na resposta imune a esse parasito (White, 2011); além disso, a grande dependência da proteína DBP para a invasão das células vermelhas, o que pode tornar a resposta de anticorpos bloqueadores em *P. vivax* mais eficiente.

Vale ressaltar que, a escassez de estudos voltados para o entendimento de uma resposta imune adquirida ao *P. vivax* dificulta o desenvolvimento de estratégias de controle eficiente contra esse parasito (Mueller *et al.*, 2013), como por exemplo, o desenvolvimento de uma vacina eficaz (Marsh e Kinyanjui, 2006). Uma vez que, o *P. vivax* é a espécie mais prevalente fora do continente Africano, capaz de causar malária e o mais prevalente no nosso país (WHO, 2016), estudos direcionados a esse parasito se fazem cada vez mais necessários.

1.4 Proteínas de estágios sanguíneos candidatas à vacina contra o *P. vivax*

Estudos epidemiológicos realizados com *P. vivax* mostram que, em condições de exposição natural, a imunidade desenvolvida contra esse parasito pode ser

estabelecida tanto em áreas de alta transmissão como na Papua-Nova Guiné (Lin *et al.*, 2010), em áreas de baixa transmissão como na Tailândia (Phimpraphi *et al.*, 2008) e também em áreas de transmissão instável, como no Brasil (Da Silva-Nunes *et al.*, 2008). Porém, os mecanismos envolvidos na aquisição da imunidade adquirida não são completamente conhecidos. Muitos trabalhos mostram que os anticorpos protetores atuam principalmente contra as formas sanguíneas desse parasito, inibindo a invasão da célula hospedeira (Ceravolo *et al.*, 2008; King *et al.*, 2008; Ceravolo *et al.*, 2009; Holder, 2009; Souza-Silva *et al.*, 2014). Isto sugere que o desenvolvimento de uma vacina contra proteínas de fase sanguínea desse parasito é uma estratégia viável (Mueller *et al.*, 2015).

Um dos alvos promissores candidato a vacina contra o *P. vivax* tem sido o fragmento C-terminal de 19kD da proteína principal de superfície do merozoíto (MSP1-19). Já foi mostrado que esta proteína é capaz de induzir a geração de anticorpos de vida longa e células B de memória (Wipasa *et al.*, 2010). Outra proteína que tem se mostrado promissora como candidata a vacina de *P. vivax* é o antígeno apical de membrana -1 (AMA-1). Esta proteína parece ser essencial no processo de invasão dos gêneros *Plasmodium* e *Toxoplasma* (Tyler *et al.*, 2011). Além disso, já foi descrito que essa proteína é naturalmente imunogênica em indivíduos expostos ao *P. vivax* (Rodrigues *et al.*, 2005), e a imunização em camundongos utilizando essa proteína evidenciou o potencial imunogênico, além disso, os anticorpos produzidos contra essa proteína, foram capazes de inibir a invasão dos eritrócitos pelo parasito (Vicentin *et al.*, 2014), reforçando a importância como candidata vacinal.

Contudo, a proteína de fase sanguínea mais promissora estudada até o momento para *P. vivax* tem sido a DBPII (De Sousa *et al.*, 2014; Longley *et al.*, 2016), uma vez que, a ligação dessa proteína com o antígeno de grupo sanguíneo *Duffy* receptor para quimicinas, o DARC, é a única via de invasão aos eritrócitos conhecida para o essa espécie (Miller *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1992). De fato, indivíduos DARC negativos – que não expressam o receptor na superfície dos eritrócitos -- são naturalmente resistentes à infecção por *P. vivax* (Miller et al., 1976), o que evidencia a importância dessa proteína no ciclo de vida de *P. vivax*. Além disso, as evidências de que os anticorpos inibitórios contra a DBPII possuem papel

protetor contra a doença, sugere-se que essa proteína é um alvo promissor para a vacina contra *P. vivax* (King *et al.*, 2008; Nicolete *et al.*, 2016).

1.4.1. *Duffy Binding Protein* (DBP) de *P. vivax*

A DBP é uma proteína de aproximadamente 140kDa, localizada no micronema do merozoíto de *P. vivax*, que se liga ao DARC. Como já foi descrito acima, essa é a única via de invasão conhecida que o *P. vivax* utiliza para infectar reticulócitos (Miller *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1992). A DBP possui 7 regiões (I-VII), e o domínio de ligação da proteína com o receptor DARC está localizado na região II. A região II da DBP (DBPII) é composta por 330 aminoácidos (aa) caracterizado por um domínio de 12 resíduos de cisteína conservados (Chitnis e Miller, 1994). A importância desta proteína para garantir o parasitismo humano, bem como, evidências que indivíduos DARC negativos são altamente resistentes à infecção (Miller *et al.*, 1976), fazem desta proteína um dos alvos mais promissores para o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax*.

Com o objetivo de conhecer a capacidade antigênica e imunogênica da proteína candidata à vacina, estudos sobre a resposta imune humoral contra à DBP foram conduzidas em diversas populações de regiões geográficas, inclusive no Brasil. Nestes trabalhos, a DBP se mostrou naturalmente imunogênica em indivíduos expostos ao *P. vivax*, e a frequência de indivíduos respondedores a esta proteína é proporcional ao tempo de exposição ao parasito mensurado pela idade e número prévio de casos de malária (Cole-Tobian *et al.*, 2002; Ceravolo *et al.*, 2005; King *et al.*, 2008; Ceravolo *et al.*, 2009; Souza-Silva *et al.*, 2010; Kano *et al.*, 2012). Além disso, os trabalhos evidenciaram que os anticorpos direcionados à DBPII podem ter a capacidade de inibir a interação entre DBPII-DARC, o que infere que possam impedir a invasão dos reticulócitos pelos merozoítos (Grimberg *et al.*, 2007; Ceravolo *et al.*, 2008; King *et al.*, 2008; Ceravolo *et al.*, 2009; Chootong *et al.*, 2010; Chootong *et al.*, 2012; Souza-Silva *et al.*, 2014). Inclusive, a presença de anticorpos com alta capacidade bloqueadora da interação DBPII-DARC já foi associada à proteção clínica contra a doença (King *et al.*, 2008; Nicolete *et al.*, 2016).

Apesar desses resultados animadores, grande parte dos indivíduos não são capazes de montar uma resposta de anticorpos contra a DBP, inclusive em populações residentes em áreas de alta endemicidade para a malária, como os países do Sudeste Asiático (Cole-Tobian *et al.*, 2009). A baixa imunogenicidade da DBPII pode ser explicada pelo fato dessa proteína ser exposta somente no momento da invasão dos reticulócitos (Adams *et al.*, 1990); e pelo fato da DBP ser altamente polimórfica (Tsuboi *et al.*, 1994; Cole-Tobian e King, 2003).

Um estudo pioneiro conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, realizado com indivíduos de um surto ocorrido em Minas Gerais - região não endêmica para malária – mostrou, pela primeira vez, que os anticorpos gerados contra a DBP foram capazes de bloquear apenas a interação da DBP-DARC da proteína do isolado causador do surto, não sendo capaz de inibir a interação proteína-receptor de outra variante de DBP. Este resultado demonstrou que os anticorpos inibitórios gerados contra a DBP é variante específica (Ceravolo *et al.*, 2009). Em seguida, outros trabalhos mostraram resultados semelhantes onde a resposta de anticorpos inibitórios contra DBP foi associada a proteção homóloga (Cole-Tobian *et al.*, 2009; Chootong *et al.*, 2012). Nesse sentido, devido à grande variabilidade entre os isolados geográficos de DBPII, sugere-se que pelo menos sete variantes deveriam ser incluídas na vacina contra *P. vivax* para ter uma cobertura de 60% das sequência de DBP já descritas (Nobrega De Sousa *et al.*, 2011).

Apesar desses achados tornarem o potencial da DBP como candidato a vacina questionável, estudos mostram que indivíduos residentes na Amazônia brasileira com histórico de longa exposição à malária (Ceravolo *et al.*, 2008) e em crianças assintomáticas da Papua-Nova Guiné (King *et al.*, 2008) são capazes de produzir anticorpos inibitórios com alta porcentagem de inibição. Além disso, anticorpos inibitórios já foram associados a proteção clínica, inclusive para diferentes variantes da DBPII (King *et al.*, 2008). Resultados semelhantes também foram encontrados recentemente em uma população de área rural no estado do Acre. Além disso, Nicolete *et al.* (2016) mostraram que, uma vez adquirida a resposta de anticorpos inibitórios com ampla reatividade a diferentes variantes de DBPII é protetora e duradoura.

Esses dados deixam claro que a geração da resposta imune a DBP é complexa. Dessa forma, para que essa proteína seja utilizada em uma vacina é necessário o desenvolvimento de estratégias que auxiliem na geração de uma resposta de anticorpos capaz de abranger todas as variantes da proteína.

1.4.2 Protótipos vacinais da DBPII – DEKnull e DEKnull2

Apesar do polimorfismo presente na DBPII, a existência de indivíduos capazes de produzir anticorpos que respondem a mais de uma variante dessa proteína (Ceravolo *et al.*, 2008; Nicolete *et al.*, 2016) sugere que a resposta de anticorpos pode estar sendo direcionada para as regiões conservadas.

Chootong *et al.* (2010) na tentativa de mapear epítopos associados com imunidade protetora da DBPII utilizaram soros de indivíduos com alta capacidade de inibição da interação DBPII-DARC, onde identificaram epítopos dominantes de células B altamente polimórficos na DBPII, sugerindo que preferencialmente há o direcionamento da resposta de anticorpos aos epítopos polimórficos ao invés de epítopos conservados. De importância, recentemente utilizando anticorpos monoclonais com capacidade bloqueadora da interação da DBPII-DARC, um estudo identificou que mais de 90% dos epítopos reconhecidos são conservados nas sequências de DBPII analisadas (Chen *et al.*, 2016). A identificação desses epítopos pode contribuir para a geração de uma vacina baseada em DBPII capaz de abranger todas, ou grande parte, das variantes dessa proteína.

Neste sentido, Ntumngia e Adams (2012) têm desenvolvido protótipos vacinais sintéticos de DBPII com a finalidade de gerar uma resposta imune humoral específica que transcenda as diferentes variantes do parasito. Esses antígenos têm como base a deleção por mutação de epítopos dominantes de células B variantes e que não são relevantes para a estrutura 3D da proteína. Dois protótipos vacinais baseados nessa estratégia vêm sendo estudados. O primeiro é a DEKnull – que consiste na deleção do epítopo dominante de células B, DEKAQQRRKQ -- a qual se mostrou imunogênico e capaz de gerar anticorpos com a capacidade de bloquear a interação ligante-receptor em ensaios de imunização em camundongos (Ntumngia e Adams, 2012). A segunda é DEKnull-2 (Ntumngia *et al.,* submetido), que foi

desenvolvida a fim de otimizar a resposta imune gerada pelo protótipo DEKnull, uma vez que, os níveis de anticorpos produzidos por este protótipo foram menores que os obtidos para a variante de referência Salvador -1 (Sal-I). A DEKnull2, foi desenhada com alteração dos resíduos polimórficos não conformacionais ao longo da região II da proteína. Os resultados preliminares são mais promissores, pois este novo protótipo vacinal mostrou elevada imunogenicidade em camundongos, títulos mais altos de anticorpos inibitórios e capacidade parcial de bloquearem a interação contra diferentes variantes de DBPII (Ntumngia *et al.,* submetido).

Dessa forma, faz-se necessário conhecer os mecanismos celulares que levam a produção de anticorpos neutralizantes contra protótipos vacinais baseados na DBPII visando o aprimoramento desta proteína como candidato a vacina contra a malária vivax.

1.4.3 Proteína de Superfície do Merozoíto (MSP1-19) de *P. vivax*

A maioria dos trabalhos desenvolvidos na busca por candidatos à vacina contra *P. vivax* tem como foco a MSP1, uma proteína de alta expressão na superfície do merozoíto (Beeson *et al.*, 2016). O fragmento C-terminal de 19kDa dessa proteína é produzido após sucessivas clivagens da proteína principal durante o processo de invasão do merozoíto aos reticulócitos (Soares *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2002; Soares e Rodrigues, 2002). Um estudo sobre a resposta imune humoral contra a MSP1-19 em residentes de áreas de baixa transmissão de *P. vivax* na Tailândia mostrou que esta proteína é capaz de induzir a geração de células B de memória e anticorpos de longa duração mesmo após seis anos na ausência de transmissão de malária (Wipasa *et al.*, 2010). Outros trabalhos também já mostraram que anticorpos produzidos contra esta proteína são capazes de persistirem após longos períodos mesmo na ausência de exposição ao parasito (Braga *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2004). Porém, poucos estudos mostram a capacidade protetora dos anticorpos produzidos contra a MSP1-19 (Versiani *et al.*, 2013).

Contudo, a maioria dos trabalhos citados anteriormente realizados com a MSP1 mostram que a proteína é capaz de induzir resposta de alta reatividade em indivíduos com histórico de exposição recente ao *P. vivax*, sugerindo que essa proteína tenha potencial como biomarcador de infecção recente ao parasito.

2 JUSTIFICATIVA

Das cinco espécies responsáveis pelos casos de malária registrados no mundo, *P. vivax* é o que possui a maior distribuição global, sendo responsável por 41% dos casos registrados fora da África (WHO, 2016). No Brasil, a região da Amazônia Legal é endêmica para a doença, onde 84% dos casos registrados da doença são causados por esta espécie de plasmódio (Saúde, 2015a).

Evidências de resistência do *P. vivax* às drogas atualmente disponíveis, bem como o aumento de morbidade e mortalidade atribuídos ao potencial de recidivas desse parasito (Price *et al.*, 2007; Alexandre *et al.*, 2010) constituem motivos de preocupação, o que reforça a necessidade de se desenvolver uma vacina que possa contribuir no controle dessa doença. No entanto, a busca por uma vacina eficaz contra esse parasito apresenta dificuldades dada a complexidade biológica dessa espécie (Mueller *et al.*, 2013). Para o desenvolvimento de uma vacina eficaz é necessário que se conheça os requisitos e mecanismos de desenvolvimento de resposta imune protetora e duradoura contra o antígeno em estudo – a DBPII.

Embora a importância dos anticorpos na imunidade contra a malária esteja bem estabelecida (Cohen *et al.*, 1961; Sabchareon *et al.*, 1991), os estudos da resposta humoral, com o foco na geração e manutenção de MBCs, particularmente contra o *P. vivax* tem sido pouco investigado. Os trabalhos realizados em áreas endêmicas, até o momento, demonstraram que os títulos de anticorpos contra antígenos da fase sanguínea do *P. falciparum* diminuem rapidamente após a malária aguda (Crompton *et al.*, 2010) e que a reinfecção periódica é requerida para manter altos títulos de anticorpos contra esses antígenos (Marsh e Kinyanjui, 2006; Crompton *et al.*, 2010). Estes dados indicam que os anticorpos induzidos pela infecção malárica são de vida curta e que a geração de células B de memória de vida longa parece ser deficiente (Tongren *et al.*, 2006).

Os estudos realizados com *P. vivax* sobre os mecanismos de invasão em eritrócitos, levam a crer na viabilidade de desenvolvimento de uma vacina capaz de bloquear e impedir o desenvolvimento do estágio sanguíneo desse parasito (Patarroyo *et al.*, 2012). De fato, para o *P. vivax* até o momento, a única via da

invasão conhecida é a mediada pela ligação da proteína DBP com o antígeno de grupo sanguíneo DARC (Miller *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1992). De importância, trabalhos já mostraram que indivíduos expostos ao *P. vivax* são capazes de montar resposta de anticorpos capaz de bloquear a interação da DBPII com o seu receptor (Grimberg *et al.*, 2007; Ceravolo *et al.*, 2008; King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2014) o que reforça seu potencial como candidato à vacina contra esse parasito. Apesar disso, estudos sugerem que a resposta gerada contra essa proteína é variante-específica (Ceravolo *et al.*, 2009; Cole-Tobian *et al.*, 2009; Chootong *et al.*, 2012), o que pode ser explicado pelo fato dessa proteína ser muito polimórfica (Tsuboi *et al.*, 1994; Cole-Tobian e King, 2003).

Visando o desenvolvimento de uma vacina contra a malária vivax com base em DBPII e de otimizá-la como candidato potencial, tem sido desenvolvido diferentes protótipos sintéticos de DBPII baseados em epítopos dominantes e conservados de células B capaz de induzir resposta com potencial para bloquear diversos variantes de DBPII *in vitro* (Ntumngia *et al.*, 2014). O protótipo DEKnull2 tem mostrado elevada imunogenicidade em modelo murino, dos quais os soros policlonais monoespecíficos foram capazes de bloquear em quase 80% a invasão de *P. vivax* em reticulócitos na presença dos anticorpos anti-DEKnull2 (Ntumngia *et al.,* submetido).

Devido à escassez de estudos em *P. vivax* e considerando a importância do entendimento da aquisição da resposta imune no desenvolvimento de uma vacina, o nosso trabalho teve como proposta estudar a resposta imune de longa duração frente ao antígeno candidato à vacina, DBPII, e seus protótipos, incluindo as células B de memória e anticorpos específicos.

3 OBJETIVO

Avaliar a resposta de células B de memória na malária vivax, com ênfase no desenvolvimento da resposta imune duradora contra a DBPII de *P. vivax*, tendo como base uma população de área não endêmica, exposta uma única vez a malária, e outra população residente em área endêmica para a malária.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil da resposta de anticorpos contra DBPII e seus protótipos, em indivíduos expostos a um surto de malária causada por *P. vivax* registrado em Minas Gerais no ano de 2003 e 12 anos após o surto;
- Avaliar resposta de células B de memória de longa duração em indivíduos expostos a um surto de malária depois de 12 anos;
- Avaliar o balanço das subpopulações de células B e o perfil da resposta de anticorpos contra a DBPII e seus protótipos em indivíduos residentes em área endêmica para malária no Brasil;

4 METODOLOGIA

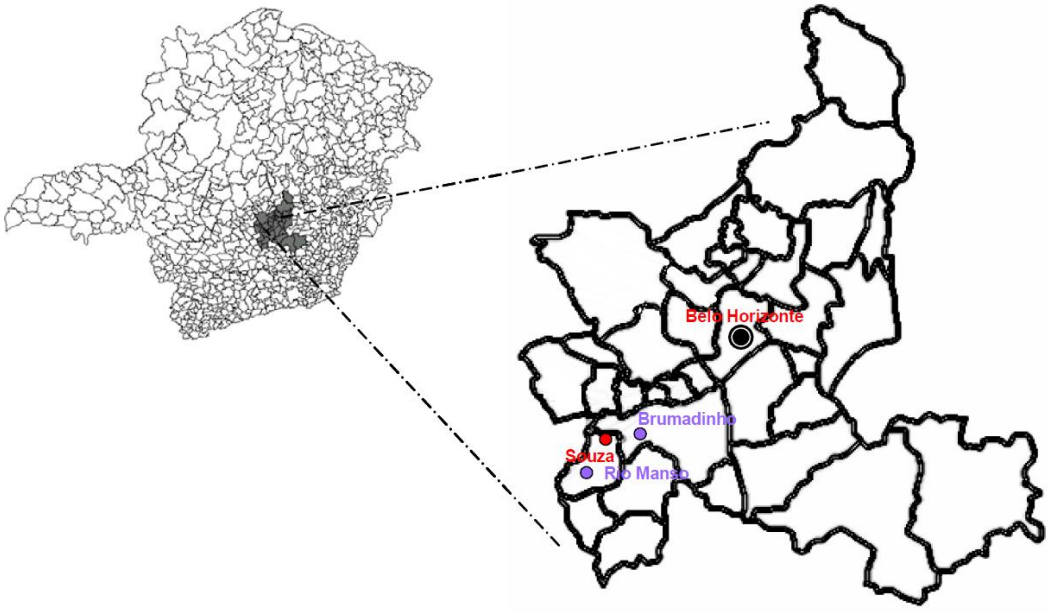
4.1 Área de estudo

4.1.1 Área de transmissão autóctone - extra-Amazônica

No período de abril a maio de 2003 foi descrito pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais e Coordenação de Gestão da Região metropolitana de Belo Horizonte, um surto de malária no distrito de Sousa (Figura 1), município de Rio Manso, localizado a 79 km de Belo Horizonte. Antes do surto, a doença nunca havia sido registrada na região. Na ocasião, a busca ativa por casos levou a identificação de 25 indivíduos com malária causada por *P. vivax,* todos diagnosticados por microscopia ótica, que foram tratados de acordo com o protocolo terapêutico estabelecido pelo Ministério da Saúde (Cerbino *et al.*, 2004). O inquérito epidemiológico identificou como fonte provável do surto um morador de Rio Manso que retornou do município de Humaitá, no estado do Amazonas, no final de 2002 e apresentou episódios de recaídas da malária pelo *P. vivax*. A pesquisa entomológica realizada na região considerou a área como altamente receptiva a doença devido a presença do vetor *Anopheles darlingi* (Cerbino *et al.*, 2004). Após o tratamento, todos os indivíduos foram submetidos a exame de verificação de cura onde 11 (44%) dos 25 pacientes diagnosticados apresentaram quadros de recaída (Zumpano *et al.*, 2004), causados pelos hipnozoítos, que são formas latentes do *P. vivax* (Krotoski, 1985). O surto foi prontamente controlado pelo rápido tratamento adequado, acompanhamento dos doentes e pela aplicação espacial e residencial de inseticida residual (Cipermetrina) (Cerbino *et al.*, 2004).

Na ocasião, o grupo de pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária do CPqRR/Fiocruz Minas, conduziu um estudo, do tipo longitudinal, para caracterizar a resposta imune humoral contra a DBP (Cerávolo, 2007). O estudo realizado foi do tipo caso-controle incluindo 15 dos 25 (60%) indivíduos diagnosticados com malária no momento do surto (casos) e 18 indivíduos que residiam no local, mas que não se infectaram (não-casos). Esses indivíduos foram acompanhados por cerca de 12 meses para avaliar a duração da resposta de

anticorpos contra a DBP após uma única exposição ao *P. vivax* (Ceravolo *et al.*, 2009).



(Cerávolo, 2007)

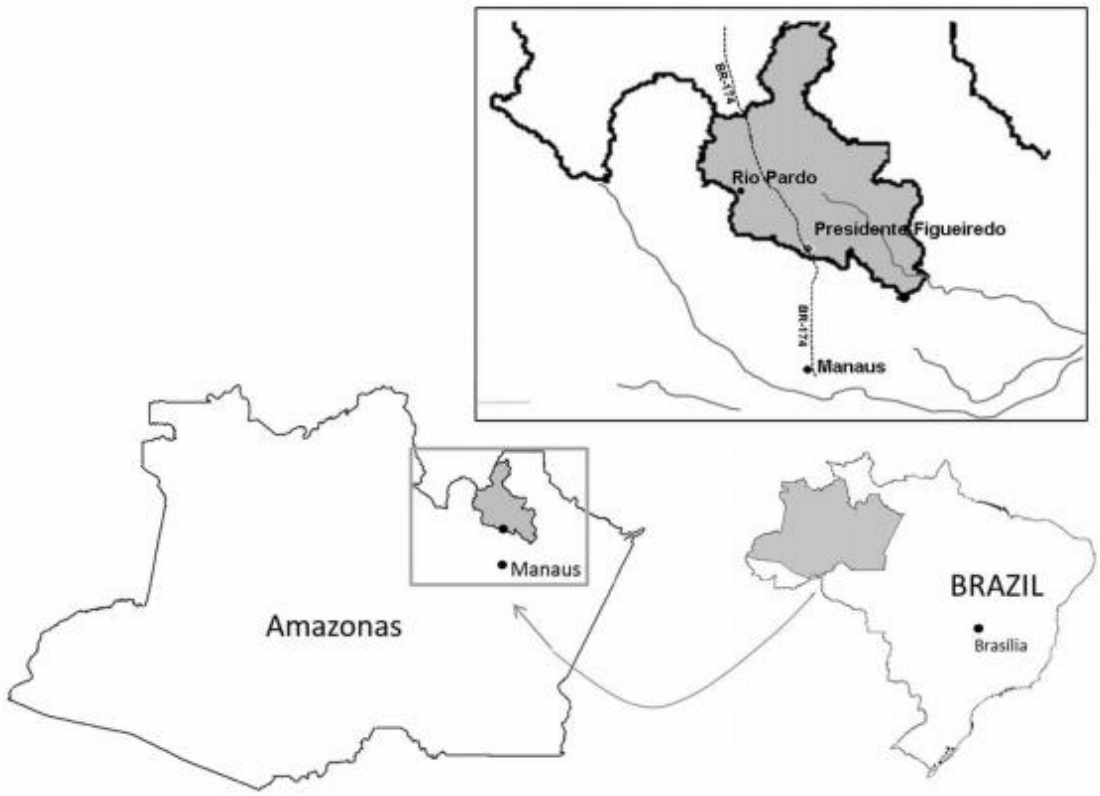
Figura 1- Mapa da região metropolitana de Belo Horizonte indicando a localização do distrito de Sousa, município de Rio Manso, MG.

4.1.2. Área de transmissão endêmica - região Amazônica

4.1.2.1 Estudo de base populacional

O estudo foi desenvolvido no assentamento agrícola de Rio Pardo (1º46'S, 1º54'S, 60º22'O, 60º10'O), localizado no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas. Rio Pardo fica à aproximadamente 160 km de Manaus, com acesso pela rodovia (BR-174) que liga o estado do Amazonas ao estado de Roraima (Figura 2). O assentamento agrícola foi oficialmente criado em 1996, pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), como parte dos grandes projetos de colonização da Amazônia focados na agricultura e ocupação humana da região (de Castro et al., 2006). Neste assentamento, a população vive principalmente da agricultura de subsistência e da pesca. Nesta área, um censo da população foi realizado previamente ao estudo (setembro a outubro de 2008) e identificou 701

habitantes. O serviço de saúde local disponíveis é restrito, existindo apenas um posto de diagnóstico de malária, administrado pelo município, que fornece o diagnóstico e tratamento gratuito para os moradores da área. Na localidade, a temperatura média anual é de 31ºC, com clima úmido e precipitação média anual de 2.000 mm por ano. Na área existem duas estações bem definidas: um período chuvoso (novembro a maio) e um período de seca (junho a outubro).



(Kano *et al.*, 2012).

Figura 2- Mapa do estado do Amazonas, indicando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, AM, e a cidade de Manaus, a capital do estado

4.1.2.2 Indivíduos com malária aguda de área endêmica

Indivíduos residentes em área endêmica de malária que procuraram o Hospital do Centro Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho – Rondônia, e foram diagnosticados com malária causada por *P. vivax* pela gota espessa*,* no ano de 2009 foram incluídos neste estudo. O município de Porto Velho registrou no ano referido 19.761 casos, com um IPA de 62,4 lâminas positivas por 1.000 habitantes sendo classificada com uma região com alto risco para contrair a doença (Saúde, 2010).

4.2 Voluntários e coleta de sangue

4.2.1. Área de transmissão autóctone

Amostras de plasma coletadas durante o ano de 2003 foram mantidas no biorrepositório do grupo de pesquisas de Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM) do Centro de Pesquisas René Rachou e utilizadas para avaliação de resposta de anticorpos anti- *P. vivax*, como parte deste estudo. Em novembro de 2015, aproximadamente 12 anos após o surto de malária, um novo corte-transversal foi realizado com o objetivo de avaliar a memória imunológica aos antígenos de *P. vivax*. Os indivíduos que tiveram malária em 2003 e ainda residiam no local foram convidados a participar dessa nova etapa do estudo (caso). Além disso, moradores expostos à infecção na época do surto e que não tiveram malária (não-caso) também foram convidados a participar. Os critérios de inclusão no estudo foram: (1) participação voluntária, através do consentimento livre esclarecido (TCLE); (2) ter residido na área de estudo no momento em que ocorreu o surto e não ter visitado área endêmica de malária nos últimos 12 anos; (3) apresentar idade maior ou igual a 15 anos; (4) não apresentar incapacidade física e/ou mental, (5) não ser portador de doença aguda/crônica debilitante (6) se mulher, indicar a ausência de gravidez. Foram incluídos no estudo 13 dos 15 (86,7%) indivíduos previamente infectados com malária (caso) que participaram do primeiro trabalho (Ceravolo *et al.*, 2009) e 12 voluntários que, embora não tenham sido diagnosticados com malária na ocasião do surto, foram expostos ao risco de transmissão (não-caso). Sangue total (cerca de 40

mL) foi coletado em tubo de vacuntainer contendo heparina sódica para obtenção de plasma e células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs). Todos os participantes foram entrevistados por meio de um questionário (Anexo 1) e aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o TCLE (Anexo 2), conforme as normas vigentes para pesquisa ética envolvendo seres humanos (Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012). Como controle não exposto para a malária, foram incluídos voluntários de Belo Horizonte, MG -- que nunca viajaram para a área endêmica para malária -- cujas amostras de plasma e PBMCs fazem parte do biorrepositório do Grupo de Biologia Molecular e Imunologia da Malária do CPqRR (sob a guarda de L.H. Carvalho e F.S. Kano). Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz Minas (CAAE: 50522115.7.0000.5091).

4.2.2. Área de transmissão endêmica

Indivíduos exposto à malária sem infecção e com infecção

De cada voluntário foram coletados 40 mL de sangue total para obtenção de plasma, DNA e PBMCs, conforme descrito acima, de acordo com protocolos aprovados pelo comitê de ética do CPqRR (Protocolo CEPSH/CPqRR No.007/2006, No. 07/2009 e n° 12/2010). O estudo longitudinal de 12 meses, do tipo de coorte aberta, teve início em novembro de 2008, com três cortes transversais com intervalo de 6 meses e foi descrito com detalhes anteriormente (Souza-Silva *et al.*, 2014). Baseado no resultado da sorologia convencional realizada em estudos anteriores pelo nosso grupo (Souza-Silva *et al.*, 2014), as amostras foram selecionadas para o presente trabalho. Resumidamente, em cada corte transversal foram envolvidas cerca de 500 pessoas, onde na primeira corte foi observado que 32% dos indivíduos incluídos possuíam anticorpos contra a DBPII Sal-I, variante DBPII vinda da cepa referência, Salvador I. Na segunda corte transversal uma frequência semelhante foi observada, onde 30% dos indivíduos apresentaram anticorpos contra a DBPII Sal-I. Assim, 34 indivíduos foram selecionados para estudos de perfil das subpopulações de células B em diferentes grupos de indivíduos respondedores a DBPII- Sal-I. Além

dos dados de sorologia a DBPII outros fatores como idade, tempo de exposição a malária, número de episódios prévios de malária ao longo da vida, foram levados em consideração para selecionar esses indivíduos. A seleção dos indivíduos para essa etapa do trabalho seguiu os seguintes critérios: (i) ter participado nas duas primeiras cortes transversais; (ii) ter sido realizada sorologia convencional para detecção de anticorpos contra a DBPII; (iii) estar incluído em um dos três grupos diferentes que tiveram sorologia realizada nas duas primeiras cortes transversais onde o indivíduo apresentou sorologia positiva em ambas cortes (Persistente respondedores, PR), sorologia consecutivas negativas (Não-respondedor, NR) e os que tiveram resultados flutuante, ou seja, uma hora negativa e outra, positiva e vice-versa (Respondedor Transiente, RT).

Além disso, indivíduos com malária aguda pelo *P. vivax* foram convidados para participar do estudo. Pacientes com infecções por outras espécies de plasmódio e/ou infecções mistas foram excluídos do estudo. Inicialmente, os pacientes foram informados sobre objetivos e metodologias do trabalho e tratados após a coleta de sangue, segundo o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (Saúde, 2009).

4.3 Processamento das amostras de sangue: obtenção de plasma e das células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cell* – PBMC)

Inicialmente dos 40 mL de sangue total, foi centrifugada uma alíquota em 350 x g por 10 minutos para a obtenção do plasma. Alíquota de 500 µL de plasma foi armazena em -20 °C para realizar a sorologia. O restante do sangue foi diluído na proporção 1:1 em RPMI 1640 incompleto (24 mM bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 U/mL penicilina e 0,017 mM estreptomicina, pH 7,4). Lentamente, o sangue foi adicionado sobre uma solução de histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), na proporção de 2:1, centrifugado em 350 x g por 40 min em temperatura ambiente. O anel formado entre a interface entre o plasma e o histopaque (PBMCs) foi coletado. Após três lavagens em RPMI incompleto (350 x g

por 10 min a 4°C, 3 vezes), as células foram ressuspendidas, contadas em câmara de Neubauer e diluídas para uma concentração de $1x10^7$ células/mL em 90% de soro bovino fetal (SFB, Gibco) suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Inicialmente, a suspensão de PBMCs foram mantidas em câmara de congelamento (Nalgene) contendo isopropanol em -80°C por 24h. Posteriormente, foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) até o uso.

4.4 Proteínas recombinantes

4.4.1 *Duffy binding protein* de *P. vivax* (DBPII) e seus protótipos vacinais (DEKnull e DEKnull2)

A região II da *Duffy binding protein* recombinante (DBPII, aminoácidos 243 a 573, 39 kDa), que contém a região do ligante, foi utilizada para avaliação da resposta celular e humoral. As sequências utilizadas para produção das DBPII recombinantes foram das variantes Salvador-I (Sal-I) - cepa de referência – e Brasil-1 (BR-1), variante mais prevalente na Amazônia brasileira (Sousa *et al.*, 2010). As DBPII recombinantes foram expressadas em *Escherichia coli* e vêm sendo produzidas na rotina do laboratório, conforme protocolo bem padronizado (Ntumngia *et al.*, 2012).

Os protótipos de DBPII mutados, DEKnull e DEKnull2, foram produzidos pelo grupo do nosso colaborador, Dr. John H. Adams (University of South Florida, Tampa, EUA), segundo o protocolo modificado descrito previamente (Ntumngia e Adams, 2012).

4.4.2 Proteína de superfície do merozoíto 1 de *P. vivax* (MSP1-19)

A proteína de superfície do merozoíto 1 utilizada no estudo representa a região C-terminal de 19kDa (MSP1-19, aminoácidos entre 1616 a 1704, 19kDa) cedida gentilmente pela Dra. Irene Soares (Universidade de São Paulo, Brasil). Os detalhes da construção dessa proteína foram descritos anteriormente (Soares *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2001).

4.4.4 Antígeno da Febre Amarela

As partículas virais atenuadas da febre amarela, subcepa 17DD, o mesmo utilizado na vacina de febre amarela em humanos, foi gentilmente cedido pelo Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz Minas (lot# 103VFC015Z – Bio-Manguinhos – FIOCRUZ) e foram utilizadas como controle positivo nos ensaios de ELISpot.

4.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG contra DBPII (Sal-I e BR-1), DEKnull, DEKnull2 e MSP1-19

Os ensaios de ELISA foram realizados segundo protocolo padrão, sendo que a concentração de antígenos recombinantes e diluição dos anticorpos primários e secundários, foram determinados previamente por titulação (Souza-Silva *et al.*, 2014). Resumidamente, placas de 96 poços (NUNC MaxiSorp®) foram sensibilizadas por 12 horas a 4°C com 100 µL por poço dos antígenos nas concentrações de: 3 µg/mL de DBPII, DEKnull e DEKnull2 e 1 µg/mL para MSP1-19. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com solução de PBST (PBS 1x, 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 200 µL/poço da solução de bloqueio (PBST com 5% de leite em pó desnatado). Após 1 hora, as placas foram lavadas 10 vezes com a solução de PBST e incubadas a 37°C com 100 µL de plasma diluído a 1:100 em tampão PBST contendo 3% de leite em pó desnatado, em duplicata. Após a incubação, as placas foram lavadas 10 vezes e incubadas por 1 hora com 100 µL/poço do conjugado anti-IgG humana ligado à peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000 em PBST com 3% de leite em pó desnatado. Após a lavagem, a reação foi revelada com dihicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich) diluído em 50 mL de tampão 0,1 M citrato de sódio pH 5,0 e 40 µL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck Millipore). Após 20 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 4N. A densidade ótica foi mensurada em filtro de 492nm (DO492nm) em leitor automático de ELISA (Spectra Max 340PC 384, Molecular Devices). O limite de corte (*cut-off*) entre os positivos e negativos foi estabelecido com base na média da DO de plasma de 30 indivíduos nunca expostos à malária, acrescida de três desvios padrão. O valor obtido para DO492nm da amostra foi dividido pelo *cut-*

off para obtenção do índice de reatividade (IR). Foram considerados positivos indivíduos com IR > 1.

4.6 Cultura das PBMCs e ativação policlonal das células B de memória circulantes

PBMCs foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e, adicionadas em tubos tipo Falcon contendo 10 mL de RPMI completo (24 mM bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 U/mL penicilina e 0,017 mM estreptomicina, 10% SBF, pH 7,4) contendo 20μg/mL de benzonase® nuclease (Sigma-Aldrich). As células foram lavadas duas vezes com RPMI completo em 300 x g por 10 minutos e contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis foram ajustadas para a concentração de 15 x 10^5 células/mL em RPMI completo, adicionadas em placas de 24 poços (Costar) e incubadas por 72 horas em estufa a 37°C com 5% CO_2, acrescidas de ativadores policlonais, R848 (do grupo das imidazoquinolinas, agonista de receptor do tipo Toll 7/8 humano) (Mabtech) e Interleucina 2 (IL-2) humana recombinante (Mabtech), de acordo com Jahnmatz e colaboradores (Jahnmatz *et al.*, 2013). Além disso, células sem a presença dos ativadores policlonais foram incluídas como controle negativo para cada indivíduo.

4.7 Ensaio imunoenzimático (ELISpot) para detecção de células B secretoras de anticorpos IgG e IgM específicos para DBPII Sal-I, DBPII BR-1, MSP1-19 DEKnull, DEKnull2 e Febre amarela

O ensaio de ELISpot para detecção de células B secretoras de anticorpos do tipo IgG foi baseado no protocolo descrito por Jahnmatz e colaboradores (Jahnmatz *et al.*, 2013). Placas de 96 poços de nitrocelulose (MAHAS4510, Merck millipore) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IgG de captura MT91/145 (Mabtech) na concentração de 10μg/mL para detecção das células secretoras de anticorpos (controle de funcionalidade) e DEKnull-2, 20 μg/mL para DBPII Sal-I, DBPII BR-1, MSP1-19 e DEKnull e, 50 partículas virais de febre amarela subcepa 17DD (controle positivo) para detecção das células B secretoras de anticorpos antígeno-específicas. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 1x (137 mM NaCl 2,68 mM KCl, 10,1

mM Na2HPO4, 1,8 mM KH2PO4, pH 7,4) e bloqueadas por 30 minutos com RPMI completo em temperatura ambiente.

Após 72h de estímulo policlonal, as células foram lavadas com RPMI 1640 completo e centrifugadas por 10 minutos em 350 x g, 4°C. Posteriormente, as células viáveis foram ajustadas para as concentrações de 5 x 10^5 células/mL e 20 x 10^5 células/mL para detecção de IgG total e de IgG antígeno-específicos, respectivamente, e 100µL foram colocados em cada poço. As células foram mantidas em 37ºC com 5% CO_2 por 12-16 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS 1x para remoção das células. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo de detecção anti-IgG humano biotinilado MT78/145 (Mabtech) diluído em 1 µg/mL em PBS suplementado com 0,5% SBF e foi incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Novamente, as placas foram lavadas e incubadas 1 hora em temperatura ambiente com estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (ALP) (Mabtech) diluída 1:1000. Em seguida, 100µL do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato conjugado com Nitro azul tetrazólio filtrado (BCIP/NBT, Mabtech) foram adicionados à placa e incubado em temperatura ambiente sob abrigo da luz. O substrato foi mantido até que fossem observados os spots (cerca de 15 minutos). A reação foi interrompida com água corrente e as placas mantidas no escuro e secas.

No caso de detecção de células B secretoras de anticorpos do tipo IgM por meio de ELISpot, o mesmo protocolo e condições descritos acima para detecção de células B secretoras de IgG foi realizado, diferindo apenas nos anticorpos monoclonais de captura e detecção utilizados. A concentração de uso do anticorpo monoclonal anti-IgM de captura MT11/12 (Mabtec) foi de 15µg/mL e o anticorpo de detecção anti-IgM humano biotinilado MT22 (Mabtech) foi diluído para 1 µg/mL. O procedimento de revelação foi seguido conforme descrito acima.

A leitura dos *spots* foi realizada manualmente com auxílio de um microscópio estereoscópio (aumento de 10x). O número de *spots* por poço foi corrigido para um total de 1x10^6 PBMCs e o resultado foi expresso como número de células secretoras de IgG (IgG+ ASCs) / 1x10^6 PBMCs e células secretoras de IgM (IgM+ ASCs) / 1x10^6 PBMCs. Adicionalmente, também foi calculada a porcentagem de células

secretoras de IgG e IgM específicas entre o total de células secretoras de IgG e IgM, respectivamente.

4.8. Avaliação fenotípica de subpopulações de células B e estratégia de análise

PBMCs foram descongeladas como descrito no item 4.6. Após a lavagem as células foram incubadas com o marcador de viabilidade celular (*Live/Dead FixableDeadCell Stains*, Invitrogen, Califórnia, USA) por 15 minutos, conforme recomendado pelo fabricante. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS 1x e submetidas à marcação de superfície com um painel contendo anticorpos para avaliação de subpopulações de células B de memória. Os marcadores (anticorpos monoclonais), bem como os clones e respectivos fluoróforos utilizados neste painel estão descritos no Quadro 1. Todos os anticorpos foram previamente titulados e o volume de cada anticorpo foi ajustado dentro do painel para avaliação das subpopulações de células B. Resumidamente, os anticorpos foram diluídos em tampão de FACs (PBS 1x contendo 2% de SBF) e 100 µL do *mix* de anticorpo foram adicionados a uma concentração de 1 x 10^6 células/mL de cada indivíduo. A incubação para marcação de superfície das células com os anticorpos foi realizada por 20 minutos sob proteção da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão de FACs e centrifugadas a 350 x g por 4 minutos. As células foram ressuspendidas em PBS 1x e a aquisição foi realizada no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Pharmingen), onde foram utilizados os parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), com a finalidade de selecionar a população de linfócitos. Foram adquiridos aproximadamente um milhão de eventos de cada amostra. A estratégia de análise foi realizada utilizando marcadores descritos previamente (Weiss *et al.*, 2009). Os marcadores utilizados para definição de subpopulação de células B foram: células plasmáticas ($CD19^+CD21^-CD20^-$), células B imaturas ($CD19^+CD10^+$), células de memória clássica ($CD19^+CD27^+CD21^+$), células B de memória atípica ($CD19^+CD21^-CD27^-$). Além disso, foram incluídos marcadores de exclusão: CD14 (monócitos), CD3 (células T) e células mortas (Live/Dead). Para análise dos dados foi o utilizado o programa FlowJo versão10.

Quadro 1- Lista de anticorpos utilizados para citometria de fluxo

Marcador	Fluorófuro	Clone	Marca
CD14	eFluor 450	6ID3	eBioscence
CD3	eFluor 450	OKT3	eBioscence
IgM	Violet 570	MHM-88	Biolegend
CD20	Qdot 655	2H7	Biolegend
CD21	FITC	B-Ly4	IOtest
IgD	PE-CF594	IA6-2	BD
CD19	PE Cy7	HIB-19	BD
CD10	APC	HI10-a	BD
IgG	AlexaFluor700	GI8-145	BD
CD27	APC-Cy7	O323	BD

4.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 6.0 (GraphPad software). Inicialmente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade das variáveis analisadas. Posteriormente, o teste de Grubb foi realizado para detecção de possíveis *outliers*. As diferenças entre as medianas e/ou médias de dois grupos foram verificadas por meio do teste *t,* ou de Mann-Whitney, quando necessário. A avaliação da diferença de medianas/médias entre mais de dois grupos foi feita pelo teste de Análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Tukey ou Dunn, respectivamente, de acordo com a distribuição dos dados. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%, ou seja, valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Área transmissão autóctone - extra-Amazônica

5.1.2 Resposta de anticorpos IgG antígeno específicos em indivíduos expostos ao surto autóctone de *P. vivax*

O perfil da resposta de anticorpos IgG contra os antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* (DBPII, MSP1-19) e aos protótipos vacinais de DBPII (DEKnull e DEKnull2) foram avaliados três, 12 meses e 12 anos após o surto de malária em indivíduos diagnosticados com a doença (Figura 3, A-E), com o objetivo de avaliar a duração da resposta de anticorpos contra as proteínas recombinantes aqui estudadas.

Três meses após a fase aguda da doença, a frequência de anticorpos contra MSP1-19 foi de 93%, seguida de 30% para DBPII Sal-I e DEKnull2, e de 20% de respondedores para DBPII- BR1 e DEKnull (Figura 3). As proteínas MSP1-19 e DEKnull2 tiveram os índices de reatividade (IR) mais altos, com média de 9,5 (± 5,1) e 3,5 (± 6,9), respectivamente (Figura 3 A, C). A DEKnull foi a proteína menos imunogênica com a menor média de IR, 0,6 (± 0,5) entre as proteínas testadas (Figura 3 E). Após 12 meses do surto, observamos que a frequência de respondedores para a MSP1-19 e DEKnull2 foi estável com 91% e 33% respectivamente (Figura 3 A e C). Em relação a frequência de respondedores para a DBPII Sal-I, DBPII BR-1 e DEKnull observamos uma redução para quase metade da frequência, sendo 16,7%, 14,3% e 8,3%, respectivamente (Figura 3 B, D, E). Doze anos após o surto, nenhuma resposta de anticorpos específicos para qualquer uma das proteínas avaliadas aqui foi observada.

Vale ressaltar que, no momento do surto apenas os indivíduos que apresentavam sintomas clínicos foram submetidos ao diagnóstico diferencial para malária (gota espessa). Os indivíduos expostos ao *P. vivax* que não apresentaram sintomas clínicos na ocasião (não-caso), também foram avaliados quanto a presença de anticorpos antígeno-específicos pelo ELISA. Como esperado, nenhum indivíduo não-caso apresentou anticorpos específicos para qualquer uma das

proteínas avaliadas em nenhum momento do acompanhamento (dados não mostrados).

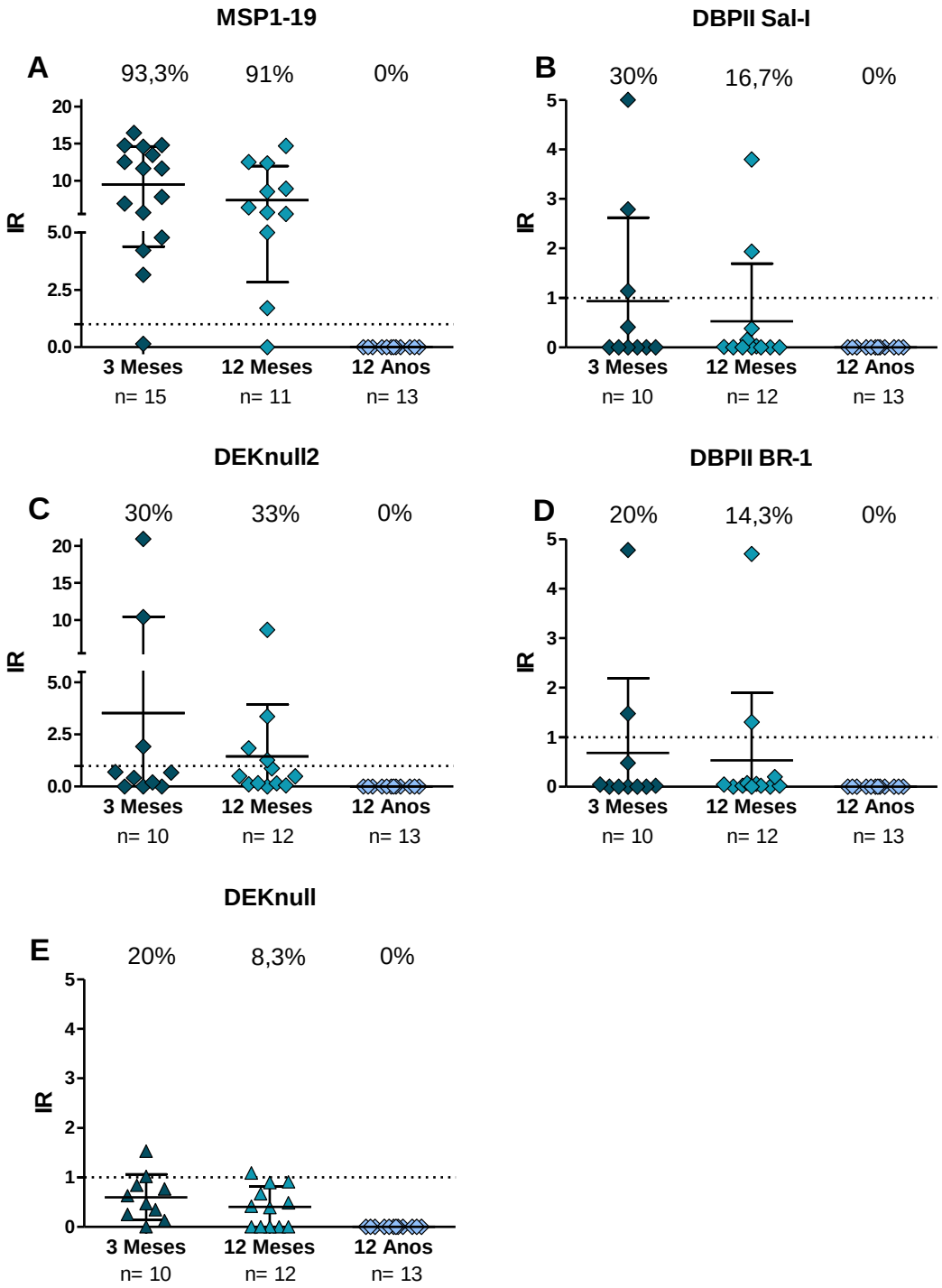


Figura 3- Resposta de anticorpos aos antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* (MSP1-19, DBPII Sal-I, DBPII BR-1, DEKnull e DEKnull2) de indivíduos diagnosticado com malária no surto autóctone ocorrido no distrito de Sousa, região metropolitana de Belo Horizonte. A resposta de anticorpos IgG antígenos- específicos de *P. vivax* foram detectados em 3, 12 meses e 12 anos após o diagnóstico para malária. A resposta de

anticorpos contra (A) MSP1-19, (B) DBPII Sal-I, (C) DEKnull2; (D) DBPII BR-1 e (E) DEKnull foram expressos em índice de reatividade (IR). O IR foi obtido pela divisão da média da Densidade Óptica (DO_{492nm}) de cada amostra pelo valor do *cut-off* (media da DO de 30 indivíduos nunca expostos ao risco de malária) para cada proteína. Amostras com valores de IR > 1 – indicado pela linha pontilhada -- foram consideradas positivas. As diferentes intensidades de azul no gráfico indicam o tempo em que a amostra foi coletada. As frequências de positivos estão representados em porcentagem nos diferentes tempos.

5.1.2 Detecção de células B de memória antígeno- específicas em indivíduos expostos ao surto autóctone de *P. vivax*

Uma vez observado que indivíduos com infecção única de *P. vivax* são capazes de montar resposta de anticorpos contra as formas sanguíneas do parasito, o segundo passo do nosso trabalho foi avaliar se os indivíduos expostos (casos e não-casos) foram capaz de gerar células B de memória específicas de longa duração para as proteínas de *P. vivax,* detectáveis 12 anos após o surto sem uma reexposição. Para isso, PBMCs de indivíduos casos e não-casos obtidos 12 anos após a exposição ao *P. vivax* foram avaliados pelo ensaio de ELISpot para detecção de células B de memória IgG+ antígeno-específicas que possuam a capacidade de se diferenciarem em células secretoras de anticorpos (ASCs) para MSP1-19, DBPII e seus protótipos vacinais, após estímulo policlonal (Figura 4 A-G). Além disso, um grupo de indivíduos nunca expostos ao risco de contrair malária foi incluído no estudo como grupo controle negativo de exposição (não exposto).

Quando comparamos a quantidade de ASCs secretoras de IgG total (ASCs IgG+ total) entre os grupos avaliados (exposto *versus* não exposto), como esperado, não observamos diferença entre a média do número de ASCs por milhão de PBMC entre os grupos (média 3505 ± 1737 ASCs/ 10^6 PBMCs *versus* 2768 ± 1724 ASCs/ 10^6 PBMCs, teste *t* p = 0,0264) (Figura 4A). Em relação à Febre Amarela (Figura 4B), também não foi observada diferença significativa entre a média da quantidade de ASCs antígeno específicas entre o grupo exposto, que foi de 60,3 (± 61,4) ASCs/ 10^6 PBMCs e grupo não exposto de 108,4 (± 157,8) ASCs/ 10^6 PBMCs (Mann Whitney, p = 0,734) (Figura 4B). O antígeno de febre amarela foi incluído no estudo por não estar relacionado à malária e pelo fato da vacinação contra esta doença fazer parte do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde. Portanto, como esperado, não observamos diferença da quantidade de ASCs específicas,

uma vez que, todos os indivíduos do grupo não-exposto (100%) e cerca de 80% (19/24) dos indivíduos expostos informaram terem sido vacinados contra Febre amarela. Os demais indivíduos do grupo exposto (20%, 5/24) não souberam responder se já haviam sido vacinados contra febre amarela, mas não descartaram a possibilidade.

Para os antígenos específicos de *P. vivax* contemplados nesse trabalho, foi observado que os indivíduos expostos ao *P. vivax* são capazes de produzir uma resposta de ASCs IgG+ antígeno- específicas, mesmo após 12 anos do surto de malária ter ocorrido (Figura 4C-G). No geral, para todas as proteínas de *P. vivax* aqui avaliadas, a quantidade de ASCs IgG+ antígeno- específicas entre os indivíduos expostos (casos e não-casos) foi maior que nos indivíduos não-expostos. Mais especificamente, observamos que a média do número de ASCs IgG+ específicas para a MSP1-19 foi significativamente maior que a média de indivíduos não exposto ao *P. vivax* (39,2 ± 30,5 ASCs / 10^6 PBMCs *vs* 5,0 ± 10,7 ASCs / 10^6 PBMCs; Mann-Whitney, p= 0,001) (Figura 4 C). Em relação à proteína DBPII Sal-I, apenas os indivíduos expostos ao *P. vivax* foram capazes de produzir ASCs IgG+ específicas (10,8 ± 11,8) não sendo observado nenhuma ASCs específicas no grupo não exposto (Mann Whitney, p = 0,002) (Figura 4 D). Da mesma forma, para a variante DBPII BR-1 apenas os indivíduos expostos foram capazes de produzir ASCs IgG+ específicas (23,90 ± 22,31; Mann Whitney, p = 0,003) (Figura 4 E). No caso do protótipo DEKnull, apenas 25% (5/20) dos indivíduos expostos foram capazes de produzir ASCs IgG+ específicas (média de 5,5 ± 9,6) (Figura 4 F). Para o protótipo DEKnull2, observamos que o grupo exposto teve alta produção de ASC IgG+ específica, similar ao observado à proteína MSP1-19, com uma média de 34,97 (± 35,11) ASCs/10^6 PBMCs. Apesar do número de ASCs IgG+ específicas aparentemente ter sido maior no grupo de indivíduos expostos quando comparado ao grupo não exposto (média de 9,06 ± 4,99), essa diferença não foi estatisticamente significativa (Mann Whitney, p = 0,100) (Figura 4 G).

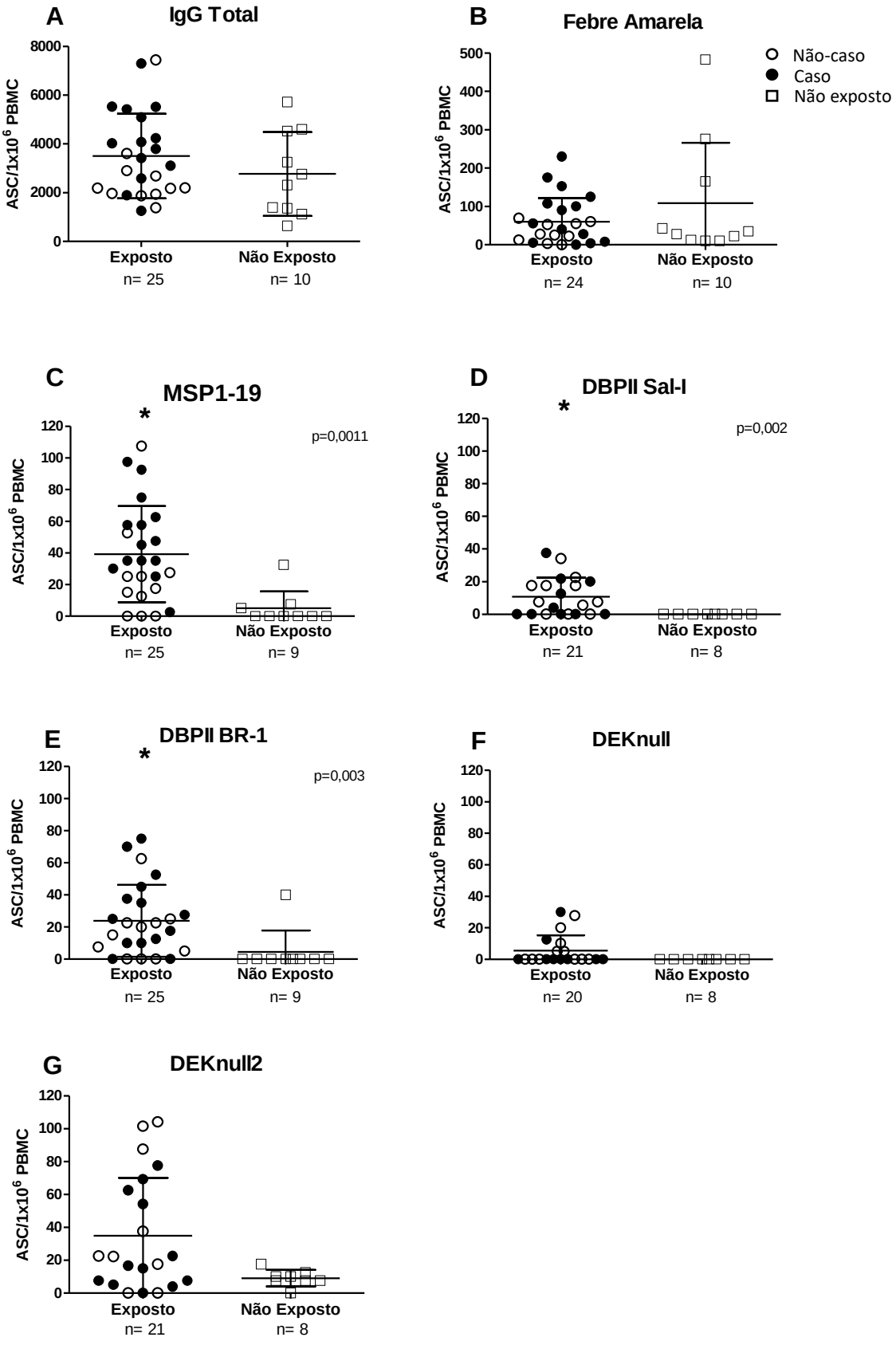


Figura 4- Resposta de células B de memória do tipo IgG antígeno específica em

indivíduos expostos ao surto de malária ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Distrito de Sousa, Rio Manso, MG, 2003). Os resultados são expressos em células secretoras de anticorpos (ASCs) por milhão (1 x 10^6) de células mononucleadas do sangue periférico (PMBC) para (A) IgG total e as proteínas (B) Febre Amarela (C) MSP1-19, (D) DBPII Sal-I, (E) DBPII BR-1, (F) DEKnull e (G) DEKnull2. Cada ponto no gráfico representa um indivíduo; as linhas horizontais indicam a média e o desvio padrão. O grupo não exposto são indivíduos de Belo Horizonte, nunca expostos à malária (controle negativo). A comparação da diferença das médias entre os grupos avaliados foi realizada utilizando teste *t* (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ($p<0,05$). O símbolo asterisco (*) identifica quando há diferença estatística significativa. Os *outliers* foram identificados pelo teste de Grubb e removidos da análise para fins de análise estatística.

Afim de avaliar as variações individuais de resposta e garantir que as diferenças observadas entre os grupos (exposto X não exposto) se deve a exposição ao parasito, os valores de ASCs IgG+ antígeno específicas foram expressos na forma de porcentagem em relação ao total de ASCs IgG+ (Tabela 1). Na Tabela 1 é possível observar que não existe diferença estatística entre a proporção de ASC IgG+ antígeno específicas para o antígeno de febre amarela entre os grupos avaliados (3,5 ± 3,8 *vs* 3,7 ± 4,2; Mann Whitney p = 0,710). Entretanto, para os antígenos de *P. vivax* avaliados, foi possível observar que a média da proporção de ASCs IgG+ específicas, no grupo exposto, para a MSP1-19 (0,7) e as variantes de DBPII, Sal-I (0,8) e DBPII BR-1 (0,4), foi maior quando comparado ao grupo não exposto (Mann Whitney $p < 0,05$). Em relação aos protótipos DEKnull e DEKnull2, não foi observado diferença na média de ASCs IgG+ específica entre os grupos exposto (0,4 e 2,2, para DEKnull e DEKnull2, respectivamente) e não exposto (0,0 e 0,6, para DEKnull e DEKnull2, respectivamente). Dessa forma, os resultados aqui apresentados mostram que células B de memória IgG+ específicas são produzidas mesmo após uma única exposição ao *P. vivax* e detectadas 12 anos após a exposição ao parasito.

Tabela 1- Proporção de ASCs antígeno- específicas para o antígeno de Febre Amarela, as proteínas MSP1-19, variantes DBPII e seus protótipos vacinais em relação ao total de ASCs IgG+

Antígenos	% ASCs IgG +		*p - valor*
	Exposto Média (±SD)	Não exposto Média (±SD)	
Febre Amarela	3,5 (±3,8)	3,7 (±4,2)	*0,710*
MSP1-19	0,7 (±0,5)	0,2 (±0,5)	*0,003*
DBPII Sal-I	0,8 (±0,9)	0,0 (±0,0)	*0,005*
DBPII BR-1	0,4 (±0,4)	0,0 (±0,0)	*0,001*
DEKnull	0,4 (±0,9)	0,0 (±0,0)	*0,074*
DEKnull2	2,2 (±2,9)	0,6 (±0,5)	*0,171*

As proporções de ASCs antígeno-epecificas para cada indivíduo foram calculadas em relação às ASCs IgG+ total. A comparação da diferença das médias entre os grupos avaliados foi realizada utilizando teste *t* (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Recentemente, Krishnamurty *et al.* (2016) mostraram em camundongos, que células B de memória IgM+ são capazes de produzir anticorpos de alta avidez de forma mais rápida a uma reexposição a MSP1 de *P. chabaudi*. Esses resultados nos encorajaram a investigar se células B de memória IgM+ poderiam ser detectadas nestes indivíduos com única exposição ao *P. vivax* e após 12 anos. A Figura 5 (A - D) mostra a resposta de células B de memória IgM+ específicas para os antígenos de *P. vivax* entre os grupos exposto e não-exposto. Como esperado, após o estímulo policlonal, a quantidade de ASCs IgM+ total entre os dois grupos avaliados (exposto *vs* não-exposto) foi similar com média de 6,9 e 6,7 ASCs IgM+ total / 10^6 PBMCs (Figura 5A). Para as proteínas de *P. vivax*, (Figura 5) foi possível observar a produção de ASCs IgM+ específicas para as proteínas analisadas (Figura 5 B-D). Mais especificamente, a quantidade média de ASCs IgM+ para as variantes DBPII Sal-I no grupo exposto (489,9 ± 299) foi maior quando comparado ao grupo não-exposto (125,4 ± 97,2) (Mann Whitney, $p = 0,007$) (Figura 5 B). Resultados similares foram observados em relação a variante de DBPII BR-1 (461,0 ± 318; exposto *vs* 96,3 ± 63,2; não-exposto, $p = 0,009$) (Figura 5 C) e para o protótipo DEKnull2 (392,8 ± 279,6; exposto vs 84,9 ± 49,6; não-exposto, $p = 0,011$) (Figura 5 D).

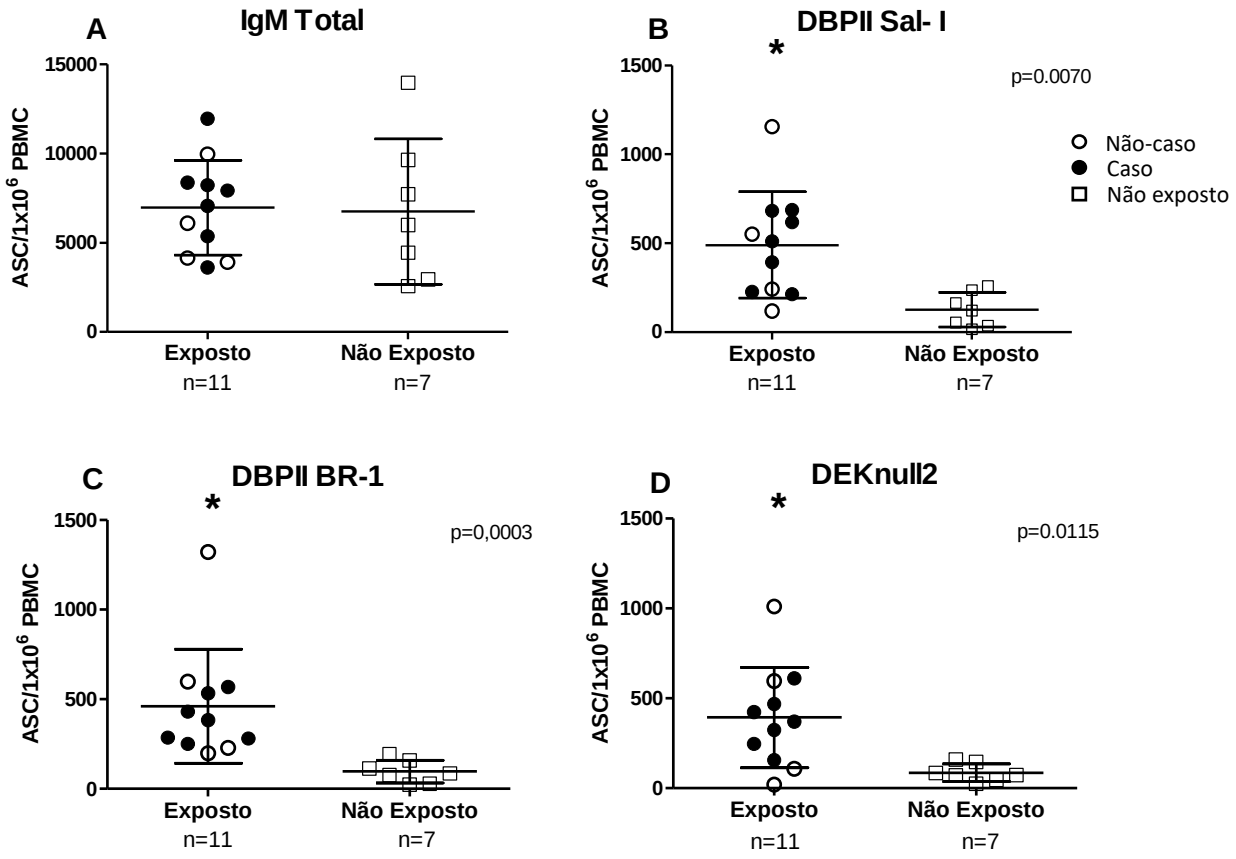


Figura 5- Resposta de células B de memória IgM+ antígeno-específica em indivíduos expostos ao surto autóctone de malária ocorrido na região metropolitana de Belo Horizonte (Distrito de Sousa, Rio Manso, MG, 2003). Os resultados foram expressos em células secretoras de anticorpos (ASCs) por milhão (1 x 10^6) de células mononucleadas do sangue periférico (PMBC) para (A) IgM total e as proteínas (B) DBPII Sal-I (C) DBPII BR-1 e (D) DEKnull2. Cada ponto no gráfico representa um indivíduo, e as linhas horizontais indicam a média e o desvio padrão da média. O grupo não exposto são indivíduos de Belo Horizonte, nunca expostos à malária (controle negativo de exposição). A comparação da diferença das médias entre os grupos avaliados foi realizada utilizando teste *t* (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% (p<0,05), o símbolo asterisco (*) identifica diferença estatística significativa. Os *outliers* foram identificados pelo teste de Grubb para fins de análise estatística.

Assim como para ASCs IgG+ antígeno-específicas, a proporção de ASC IgM+ específicas para os antígenos de *P. vivax* foi calculada para corrigir a variação individual. A Tabela 2 mostra os valores de ASCs IgM+ antígeno-específicas expressos na forma de porcentagem em relação ao total de ASCs IgM+. Podemos observar que a diferença entre a média de ASCs antígeno-específica para as duas

variantes de DBPII Sal-I (7,0) e DBP BR-1 (6,0) e para o protótipo DEKnull2 (5,0) foi significativamente maior no grupo de indivíduos exposto quando comparado ao grupo não exposto. Esses resultados mostram que os indivíduos que já foram expostos ao *P. vivax*, são capazes de produzir ASCs IgM+ específicas para DBPII Sal-I e BR-1 e ao protótipo DEKnull2 mesmo após uma única exposição ao parasito e depois de 12 anos sem reexposição.

Tabela 2- Proporção de ASCs antígeno-específicas para DBPII e seu protótipo DEKnull2 em relação ao total de ASCs IgM+

	ASCs IgM +		
	Exposto	Não exposto	
Antígenos	Média (±SD) %	Média (±SD) %	*P-valor*
DBPII Sal-I	7,0 (± 2,8)	2,0 (± 1,2)	*< 0,001*
DBPII BR-1	6,0 (± 3,3)	1,0 (± 0,8)	*0,001*
DEKnull2	5,0 (± 3,7)	1,0 (± 0,7)	*0,008*

As proporções de ASCs antígeno- epecíficas para cada indivíduo foram calculadas em relação às ASCs IgM+ total. A comparação da diferença das médias entre os grupos avaliados foi realizada utilizando teste *t* (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ($p<0,05$).

Afim de avaliar o perfil da resposta individual para cada um dos antígenos avaliados, os individuos foram categorizados quanto à quantidade de ASC específicas em respondedores (alto, médio e baixo) e não respondedores. Para isso, o limite de resposta positiva foi arbitrariamente definido como > 20 ASCs por 1 x 10^6 PBMCs para IgG+ e > 200 ASCs por 1 x 10^6 PBMCs para IgM+. Essa categorização permitiu diferenciar os grupos avaliados em relação a resposta aos antígenos de *P.vivax* avaliados. Para resposta de MBC IgG+ foi possível verificar que 100% dos indivíduos caso responderam a pelo menos uma das proteínas avaliadas e, 85% (11/13) responderam à uma das variantes ou protótipo vacinal de DBPII, enquanto que 75% (9/12) dos não-casos responderam a pelo menos uma das proteínas avaliadas (Figura 6A). Além disso, observamos que dois (22%, 2/ 9) indivíduos não expostos apresentaram resposta, porém no limite de detecção do ensaio de Elispot. Mais especificamente para as proteínas avaliadas, a frequência de respondedores para a MSP1-19 foi de 100% em indivíduos casos e 41,66% nos não-caso, sendo

que no geral 72% (18/ 25) dos indivíduos expostos responderam a essa proteína. Além disso, 12% (3/25) dos indivíduos avaliados tiveram uma alta resposta de ASC IgG+ para essa proteína.

Em relação às variantes de DBPII, foi possível observar uma maior frequência de respondedores para a variante DBPII BR-1 (48%, 12/25), sendo a maior frequência de respondedores, observada em indíviduos caso (61,5%) quando comparado aos não-caso (33,33%). Para a variante Sal-I, 19% (4/ 21) responderam a esta variante, sendo que a frequência entre os grupos caso (22,2%) e não-caso (16,76%), foi semelhante. Entre os protótipos de DBPII avaliados, podemos ver que, a DEKnull2 mostrou uma frequência de respondedores maior com 52,3% e, também não foi observada diferença de respondedores entre os grupos caso (45%) e não-caso (60%) para esse protótipo. Em relação ao protótipo DEKnull, foi observada a menor frequência de respondedores, com 9,5%, entre todas as proteínas avaliadas.

Para a resposta de ASC IgM+ podemos observar que, 100% dos indivíduos expostos apresentaram resposta positiva a pelo menos uma das proteínas avaliadas. Além disso, foi possível observar que 100% dos indivíduos casos também apresentaram resposta de MBC IgM+ para as variantes DBPII Sal-I e BR-1, e 75% dos indivíduos não casos apresentaram alta frequência de ASC IgM+. No geral, mais de 90% dos indivíduos avaliados apresentaram resposta de MBC IgM+ para estas duas variantes de DBPII. Em relação ao protótipo DEKnull2, 73% dos indivíduos tiveram uma resposta de ASCs IgM+, sendo 86% dos indivíduos casos e 50% do grupo de não-caso. Além disso, observamos que um indivíduo não-caso foi capaz de gerar uma alta resposta IgM+ para as três construções avaliadas (Figura 6B). Assim como observado para a resposta de ASCs IgG+, dois indivíduos controle não exposto (2/7, 28%) apresentaram uma resposta próxima ao limite de detecção do ensaio, porém nesse caso, ambos os indivíduos apresentaram uma resposta para a variante DBPII Sal-I.

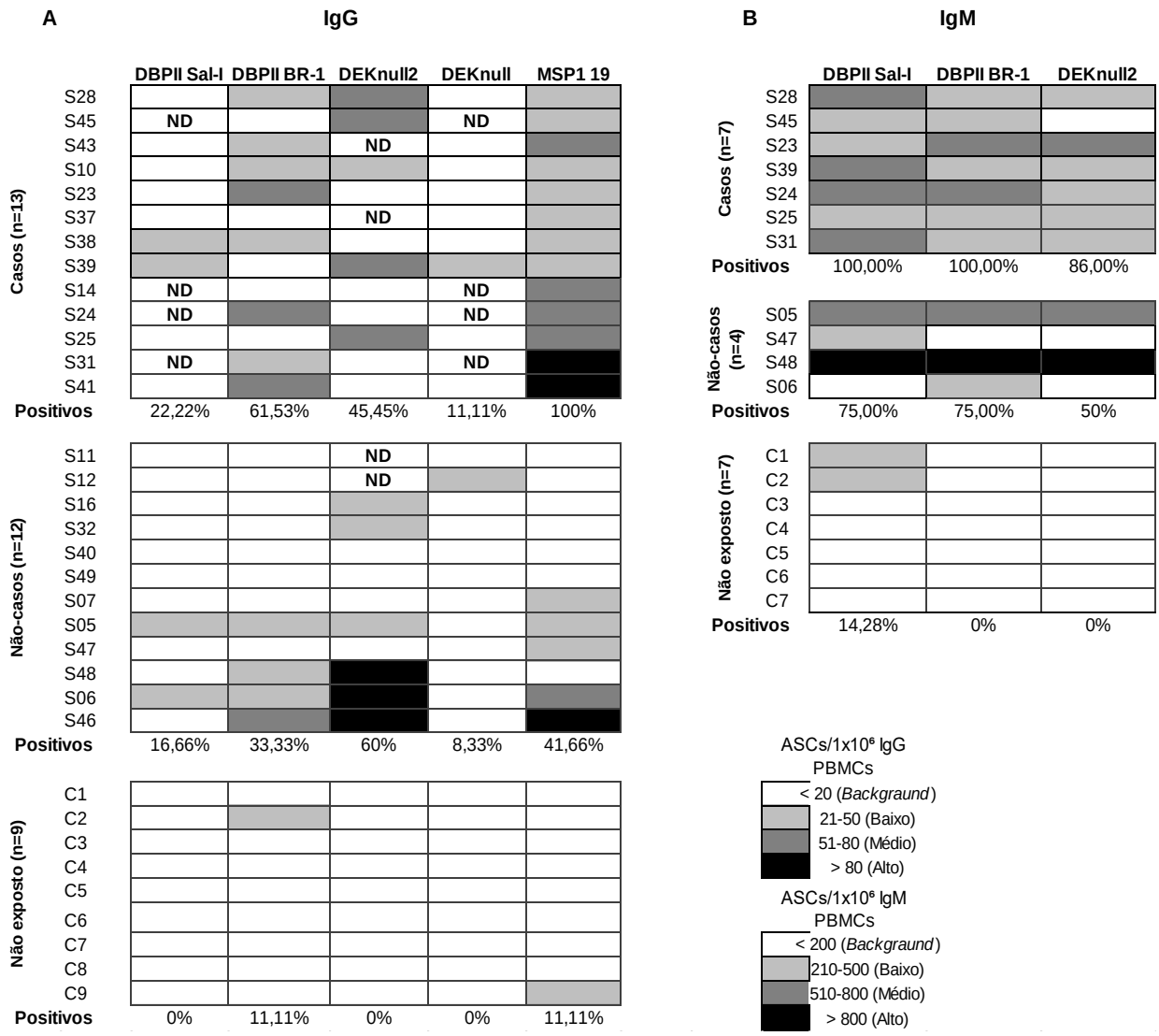


Figura 6- Resposta individual de células B antígeno-específicas nos indivíduos dos grupos exposto (caso, não-caso) e não-exposto. (A) Células secretoras de anticorpos (ASCs) antígeno específica s IgG+ para as proteínas DBPII Sal-I, DBPII BR-1, DEKnull, DEKnull2 e MSP1-19. (B) Células secretoras de anticorpos (ASCs) antígeno específicas IgM+ para as proteínas DBPII Sal-I, DBPII BR-1, e DEKnull2. Cada linha representa um indivíduo, sendo os mesmos categorizados como respondedores (>80) alto, (51-80) médio e (21-50) baixo , ou *Backgraund* (< 20) para IgG+ e respondedores (>800) alto, (510-800) médio e (210-500) baixo, ou *Backgraund* (< 200) para IgM+. Os valores abaixo da figura representam a frequência total (%) de respondedores para cada uma das proteínas avaliadas.

5.1.3 Imunofenotipagem de PBMCs de indivíduos expostos ao Surto de malária

Para avaliar o perfil total das subpopulações de células B pela imunofenotipagem, PBMCs de indivíduos exposto ao surto foram obtidos 12 anos após o episódio, e a marcação foi realizada utilizando marcadores bem estabelecidos (Weiss *et al.*, 2009) e listados no quadro 1.

A Figura 7 mostra a estratégia de análise utilizada para identificação das seguintes subpopulações de células B, do total de células CD19+ vivas: células plasmáticas (CD19+CD10+CD20-CD21-), células B imaturas (CD19+CD10+), células B naïve (CD19+CD10-CD20+CD21+CD27-) células B de memória (MBC) clássicas (CD19+CD10+CD20+CD21+CD27+), MBC ativadas (CD19+CD10+CD20+CD21-CD27+) e MBC atípica (CD19+CD10+CD20-CD21-CD27-). As médias das frequências de células B total (CD19+) vivas foram similiares de 14,20% (± 5,24) e 10,52% (± 2,77) no grupo exposto e não exposto, respectivamente (Figura 8A). Também não foi observada diferença entre as frequências de células B imaturas, MBC ativadas e MBC atípicas entre os dois grupos avaliados (Figura 8C, F-G). Para a subpopulação de células plasmáticas, foi possível observar que a frequência estava aumentada para os indivíduos não expostos (1,21 ± 1,09), quando comparadas com os indivíduos expostos (0,38 ± 0,22) (Mann-Whitney, p = 0,002) (Figura 8B). A frequência para as MBCs clássicas também se apresentou maior no grupo não exposto (17,12%) quando comparada com o grupo exposto (22,88%) (Mann Whitney p = 0,002) (Figura 8E). No caso da frequência de células B naïve foi observado que os indivíduos expostos apresentam frequência maior (73,67%) quando comparado com o grupo de indivíduos não expostos (66,56%) (Figura 8D).

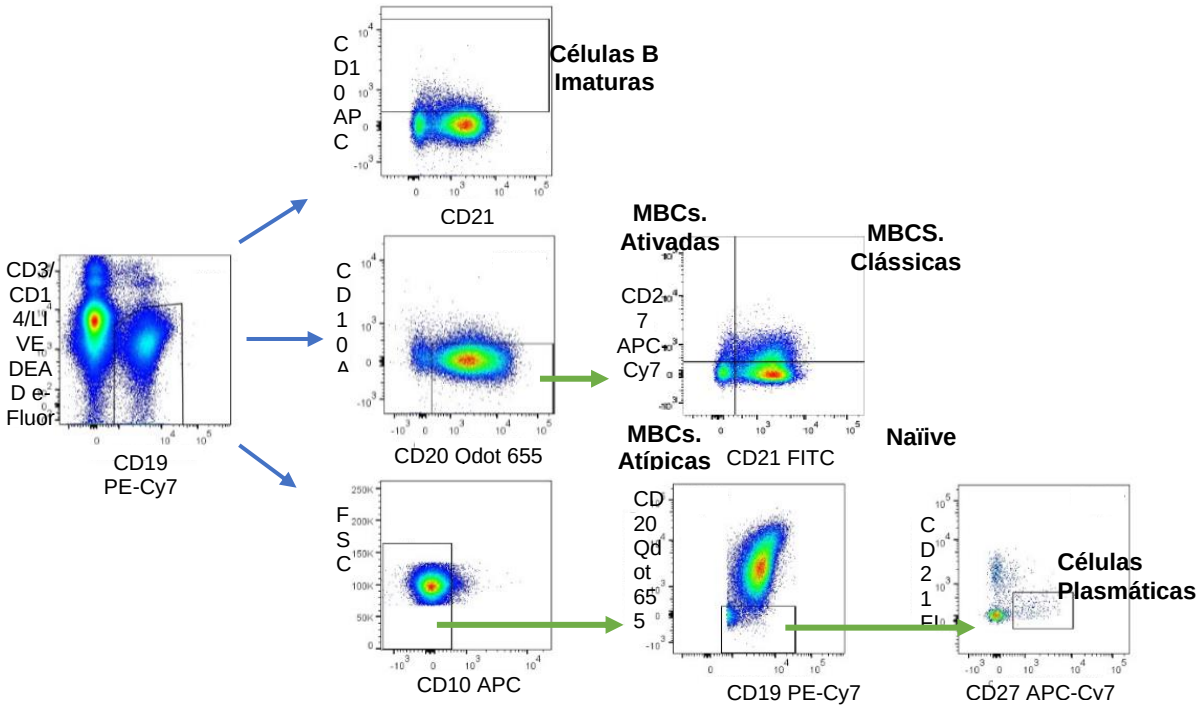


Figura 7- Estratégia de análise utilizada na imunofenotipagem de subpopulações de células B (CD19+). Após excluir os *doublets* e isolar os linfócitos por tamanho (FSC) e granolosidade (SSC) as células CD19+ vivas foram obtidas por exclusão das células mortas (*Life/Dead*+, marcador de viabilidade celular), células T (CD3+) e monócitos (CD14+). As subopulações foram identificadas com base nos marcadores: Células B de memória (MBCs) ativadas (CD19+CD10-CD20+CD21-CD27+); MBCs clássicas (CD19+CD10-CD20+CD21+CD27+); MBCs atípicas (CD19+CD10-CD20+CD21-CD27-); Células B *naïve* (CD19+CD10-CD20+CD21+CD27-); Células B imaturas (CD19+CD10+) e Células Plasmáticas (CD19+CD10+CD10+CD20-CD21-CD27+).

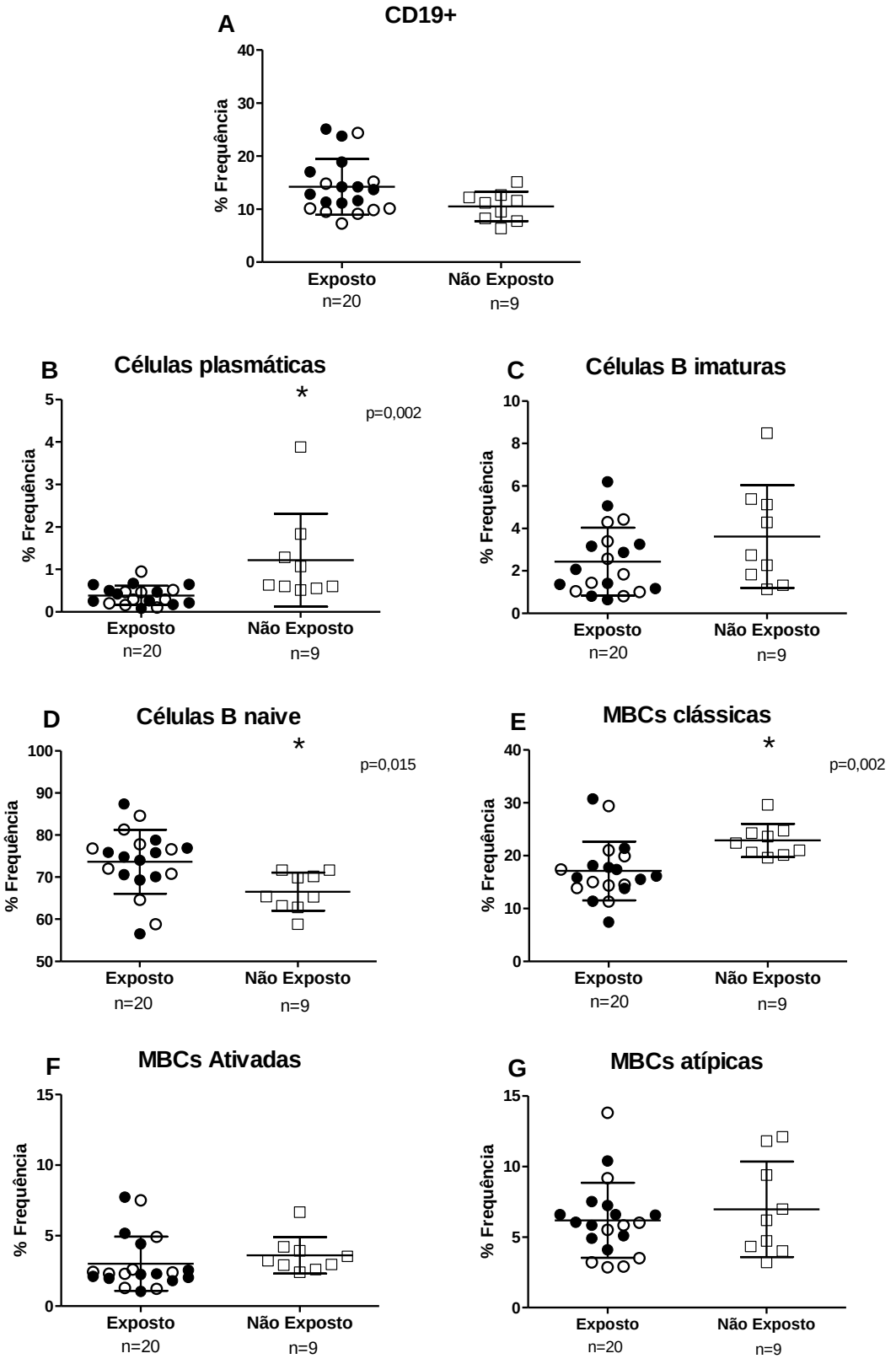


Figura 8- Subpopulações de células B em indivíduos expostos e não-expostos a um surto pelo *P. vivax*. Os gráficos mostram a frequência relativa de subpopulações de células B a partir do total de células B (CD19+) pela citometria de fluxo. As subpopulações de

células B foram identificadas conforme as estratégias mostrada na Figura 7 em: (A) Células B totais, (B) Células plasmáticas, (C) Células B imaturas, (D) células B *naïve*, (E) Células B de memória clássicas, (F) Células B de memória ativada e (G) Células B de memória atípica. Cada ponto no gráfico representa um indivíduo; as linhas horizontais indicam a média e desvio padrão. O grupo não exposto são indivíduos de Belo Horizonte, nunca expostos à malária (controle negativo). A comparação da diferença das médias entre os grupos avaliados foi realizada utilizando teste *t* (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ($p<0,05$), o símbolo asterisco (*) identifica os grupos que apresentaram diferença estatística significativa. Os *Outliers* foram identificados pelo teste de Grubb para fins de análise estatística.

5.2. Área de Transmissão Endêmica

5.2.1. Avaliação das subpopulações de células B em indivíduos de área endêmica para malária

Estudos prévios têm mostrado que a imunidade clínica contra a malária se desenvolve de forma lenta e após repetidas exposições ao parasito responsável por causar a doença. Além disso, a infecção aguda ocasiona uma desregulação na ativação e desenvolvimento da resposta imune humoral de longa duração (MBCs e anticorpos específicos). Por isso, nós avaliamos se indivíduos de área endêmica, ou seja, com contínua exposição à malária apresentavam alteração no balanço entre as subpopulações de células B. Assim, inicialmente, selecionamos um grupo de indivíduos com malária aguda causada por *P. vivax* (n=23) e um outro grupo de indivíduos sem infeção (n=34).

As características demográficas e epidemiológicas estão mostradas na Tabela 3. Os indivíduos expostos à malária envolvidos neste estudo foram adultos com mediana de idade de 34 anos (24,2 – 55,8 anos) e 45 anos (30,8–52,8 anos) nos grupos com infecção e sem infeção pelo *P. vivax*, respectivamente. Em relação ao gênero, a proporção de homem: mulher foi de 2:1 para o grupo com infecção aguda e 0,8:1 para o grupo não infectados. Além disso, a mediana do número de episódios prévios de malária que foi 6 (0- 20) para infectados e 5 (3- 11) para os não-infectados. Em todos os indivíduos o diagnóstico de malária foi realizado pelo exame da gota espessa. Em caso de diagnóstico positivo, os indivíduos foram tratados, conforme o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (Saúde, 2009). A parasitemia do grupo de indivíduos com malária variou de ½ a duas cruzes. Foi

incluído também um grupo de indivíduos que nunca foram expostos ao risco de contrair malária (não-exposto), como controle negativo de exposição (n=14). Os indivíduos controle foram todos adultos com mediana de idade de 38 anos.

Tabela 3- Características epidemiológicas e demográficas da população de área endêmica estudada.

Variáveis	**Expostos**	
	Infectados (n=23)	**Não infectados (n=34)**
Idade (mediana, IQR)	34 (24,25 - 55,75)	45 (32,25 - 53,25)
Gênero, masculino: feminino	2:1	0,8:1
Episódios prévios de malária (mediana, IQR)	6 (0-20)	5 (2,5-11)

*IQR = Intervalo interquartil
*Os episódios prévios de malária têm como base informação obtida pelo questionário epidemiológico (relatado pelo indivíduo)

A imunofenotipagem das subpopulações de células B dos grupos de indivíduos expostos - com infeção aguda pelo *P. vivax* e sem infecção – foi realizada pela citometria de fluxo utilizando os mesmos marcadores utilizados anteriormente (Quadro 1). Os resultados estão mostrados na Figura 9, onde foi observado menor frequência no total de células B CD19+ em indivíduos do grupo não-exposto (13,03%) e expostos (10,13%) com infecção pelo *P. vivax*, quando comparado ao grupo de indivíduos exposto não infectado (23,69%) (ANOVA, seguido de teste de Tukey, p< 0,0001) (Figura 9A). Não foram observadas diferenças significativas nas frequências de células B *naïve*, MBCs imaturas e MBCs clássicas entre os grupos avaliados (Figura 9 B-D). Para as células plasmáticas foi observada maior frequência dessas células nos indivíduos expostos infectado (2,52%) em relação com o grupo não-exposto (1,23%) (Kruskal Wallis, seguido de teste de Dunn, p=0,015) (Figura 9 E). Maior frequência também foi observada para as MBCs ativadas em indivíduos expostos infectado (1,99%) (não exposto 0,86%, Kruskal Wallis, p = 0,029). Além disso, foi observado que as MBCs atípicas estavam aumentadas no grupo exposto, infectado (12,1%) e não infectado (11,6%), quando comparado com o grupo de indivíduos não expostos (4,9%) (Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn, p<0,0001) (Figura 9G). Em resumo, estes dados mostram que indivíduos expostos à malária, tanto com infecção aguda pelo *P. vivax*, quanto sem infecção, apresentam um aumento das células B de memória atípica.

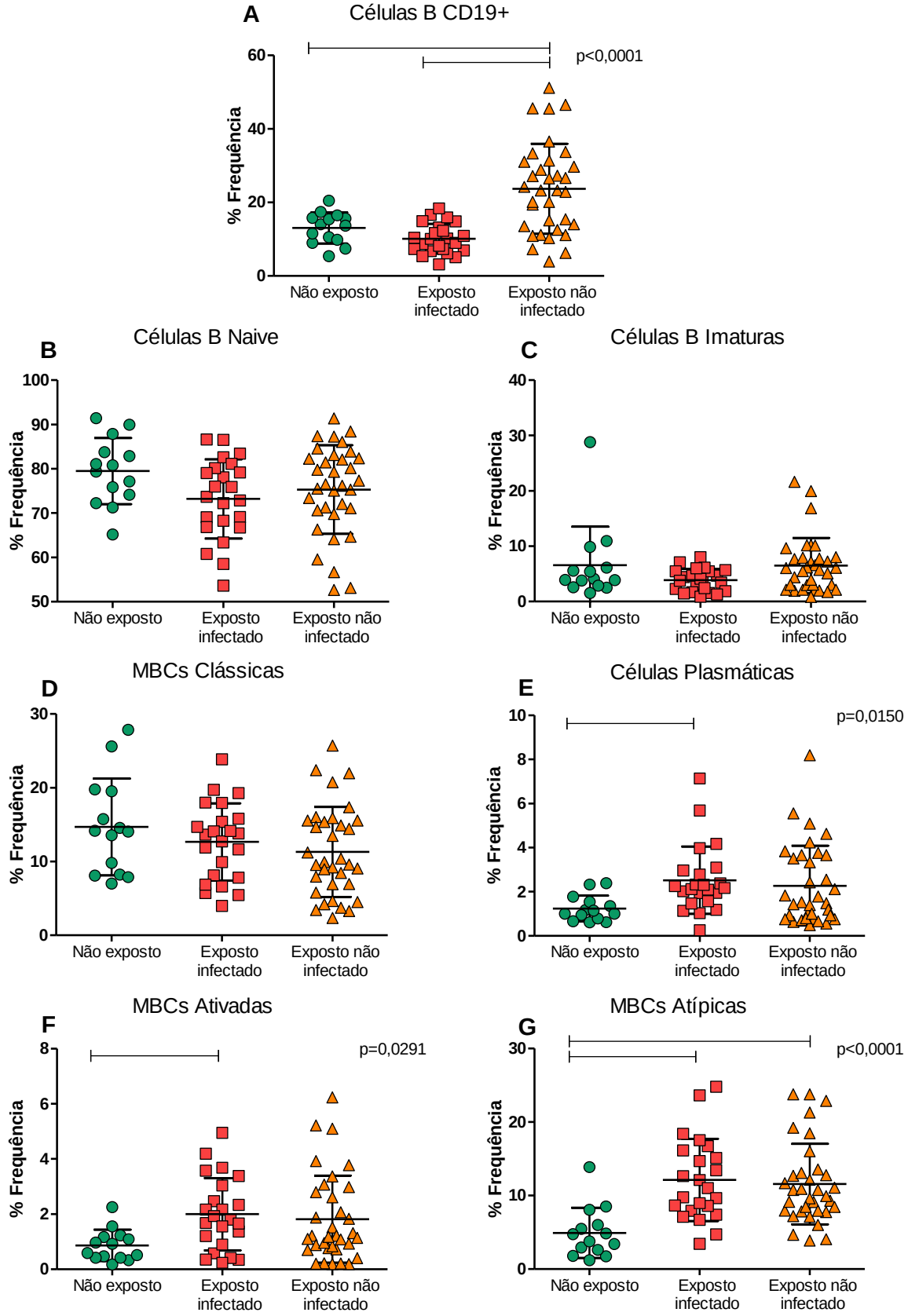

A
Células B CD19+
p<0,0001
% Frequência
Não exposto
Exposto infectado
Exposto não infectado
B
Células B Naive
C
Células B Imaturas
D
MBCs Clássicas
E
Células Plasmáticas
p=0,0150
F
MBCs Ativadas
p=0,0291
G
MBCs Atípicas
p<0,0001

Figura 9- Análise fenotípica de subpopulações de células B em indivíduos não-expostos (n=14) e expostos ao *P. vivax* infectados (n=23) e não infectados (n=34). Os gráficos mostram a frequência relativa de subpopulações de células B a partir do total de células B (CD19+) pela citometria de fluxo. As subpopulações de células B foram identificadas como (A) Células B totais (CD19+); (B) células B *naïve* (CD19+CD10-CD20+CD21+CD27-); (C) Células B imaturas (CD19+CD10+), (D) Células B de memória (MBCs) clássicas (CD19+CD10+CD20+CD21+CD27+); (E) Células plasmáticas (CD19+CD10+CD20-CD21-), (F) MBCs ativada (CD19+CD10+CD20+CD21-CD27+); (G) MBCs atípica (CD19+CD10+CD20-CD21-CD27). Cada ponto no gráfico representa um indivíduo, e as linhas horizontais indicam a média e o desvio padrão. O grupo não exposto são indivíduos de Belo Horizonte, nunca expostos à malária (controle negativo). A comparação da diferença das médias entre os grupos avaliados foi realizada utilizando teste *t* (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ($p<0,05$).

5.2.2. Resposta de anticorpos IgG total para as proteínas de formas sanguíneas de *P. vivax* e a associação com subpopulações de células B em indivíduos de área endêmica para malária

Os indivíduos residentes em área endêmica contemplados para análise de células B, também foram avaliados quanto ao perfil da resposta de anticorpos produzidos contra os antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* (MSP1-19, DBPII, DEKnull e DEKnull2) (Figura 10). Na linha de base, podemos observar que a frequência de indivíduos positivos foi maior para a proteína MSP1-19 (55,9%), quando comparado com as variantes de DBPII (Sal-I e BR-1) e os protótipos vacinais DEKnull e DEKnull2 (29,4%, 26,5%, 20,6%, 26,5% respectivamente). Além disso, as frequências da resposta de anticorpos entre as variantes e protótipos de DBPII foram similares ao longo de 12 meses. Interessantemente, notamos que existem indivíduos que foram capazes de gerar e manter a resposta de anticorpos contra todas as variantes de DBPII e aos protótipos por 12 meses (Respondedor, n = 4, 11%) e indivíduos que não produziram anticorpos contra qualquer uma das proteínas avaliadas durante o acompanhamento (Não respondedor, n = 16, 5%).

De posse desses dados, buscamos avaliar se a diferença observada na geração de anticorpos contra a DBPII nesses indivíduos poderia ser influenciada pelo balanço alterado de células B ou a expansão das MBCs atípicas. Com base nos resultados da imunofenotipagem de células B realizada nos indivíduos expostos à malária sem infecção, não foi possível observar diferença estatística entre as

subpopulações de células B avaliadas entre o grupo respondedor e não respondedor (Figura 11).

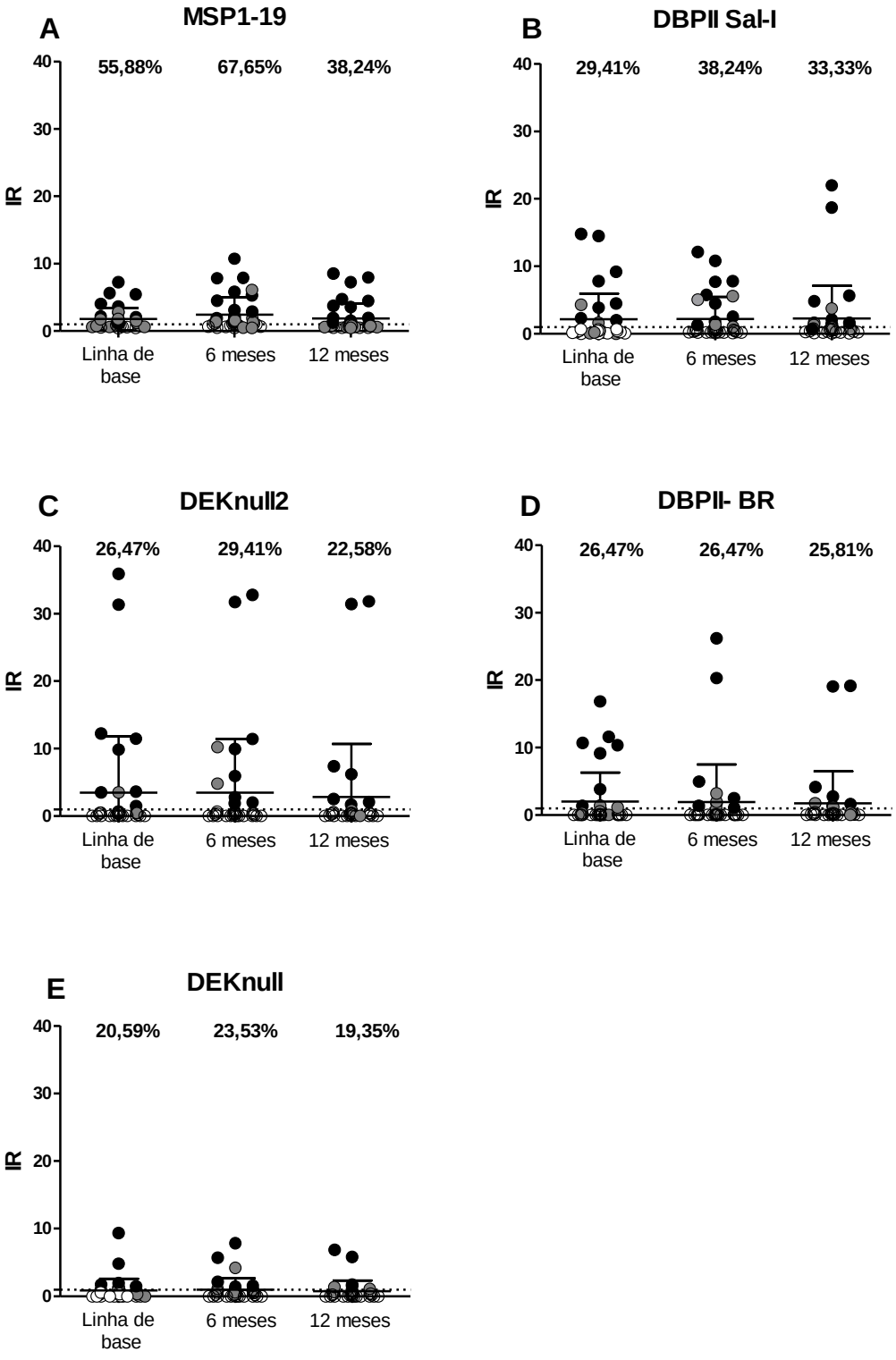


Figura 10- Resposta de anticorpos aos antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* em residentes de área endêmica para malária (Rio Pardo- AM). Os anticorpos foram mensurados pelo ELISA em plasma dos indivíduos nas três cortes transversais realizadas (novembro de 2008, junho e novembro de 2009) para as seguintes proteínas: (A) MSP1-19, (B) DBPII Sal-I, (C) DEKnull2, (D) DBPII BR-1 e (E) DEKnull2. A frequência de positividade (%) em cada corte transversal para cada proteína está indicada na parte superior do gráfico. As diferentes cores no gráfico indicam se o indivíduo não respondeu em nenhum momento do estudo para a proteína avaliada (Não Respondedor- branco); ou se o indivíduo respondeu apenas em algum momento (Respondedor Temporário- cinza); ou ainda, se o indivíduo foi capaz de responder em todos os momentos do acompanhamento para a proteína (Persistente Respondedor – preto). Os níveis de anticorpos foram expressos em Índice de reatividade (IR) que foi obtido dividindo a média da Densidade Óptica (DO_{492nm}) de cada plasma pelo valor do limite de positividade (*cut off*) para cada proteína. Valores de IR maiores que 1 (IR > 1) foram considerados positivo.

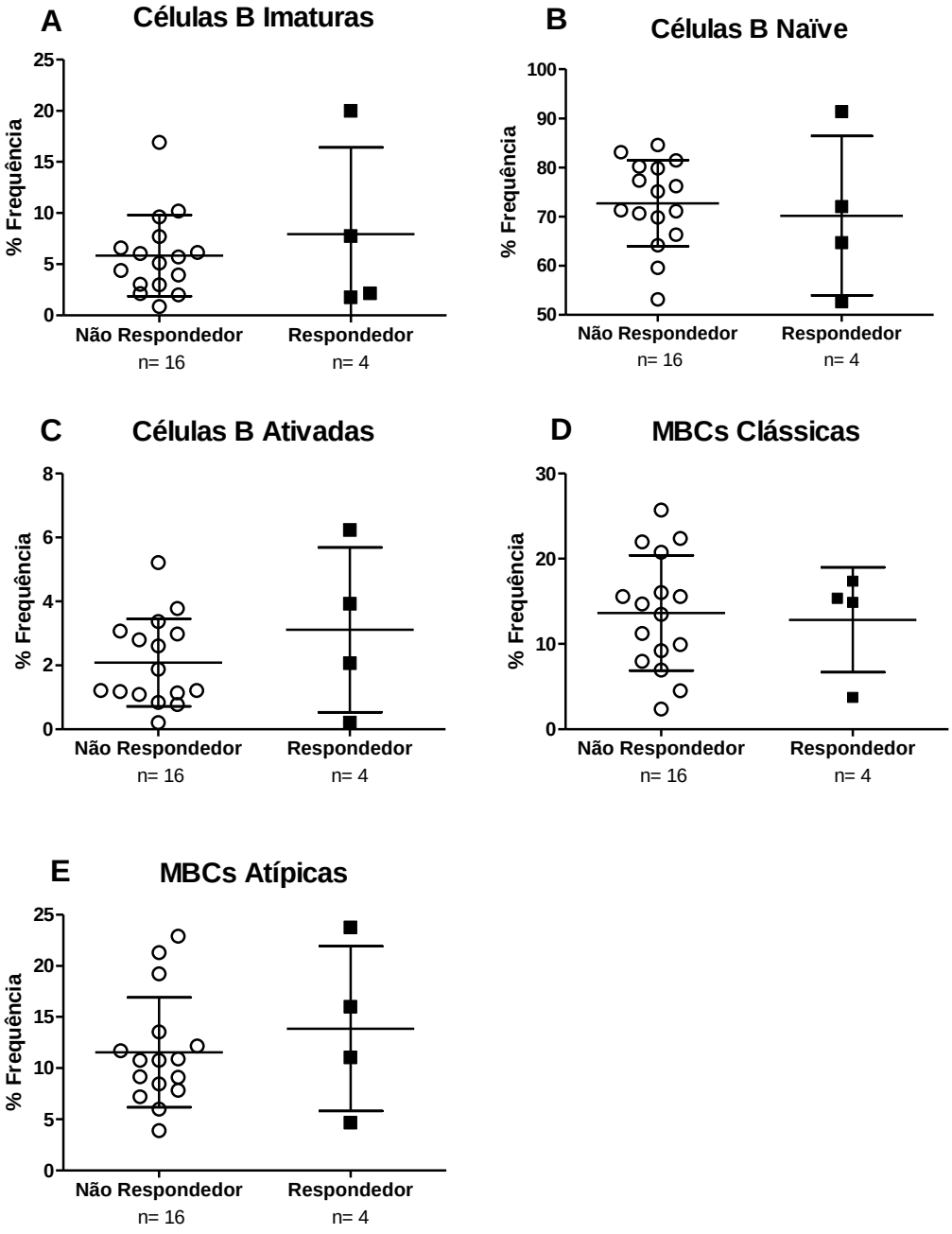


Figura 11- Análise fenotípica de subpopulações de células B em indivíduos não respondedores e respondedores aos antígenos de *P. vivax* expostos à malária. Frequência de (A) células B imaturas (CD19+CD10+); (B) células B *naïve* (CD19+CD21+CD27-); (C) MBCS ativadas (CD19+CD27+CD21-), (D) MBCs clássicas (CD19+CD21+ CD27+), e (E) MBCs atípicas (CD19+CD21+CD27-) entre os grupos não-respondedor e respondedor. O grupo não respondedor foi definido como indivíduos que não apresentaram anticorpos para todas as proteínas avaliadas (variantes de DBPII e os protótipos da família DEKnull (n=16) durante 12 meses. O grupo de respondedor foi definido como indivíduos que apresentaram sorologia positiva em todos os momentos do acompanhamento para as todas as proteínas avaliadas. A diferença entre as médias entre os grupos avaliados foi realizada utilizando teste *t* (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico) quando necessário, considerando o nível de significância de 5% ($p<0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Exposição única ao *P. vivax* induz resposta de células B de memória de longa duração

A imunidade naturalmente adquirida contra a malária é estabelecida após repetidas exposições ao parasito e diversos estudos apontam que essa imunidade é perdida na ausência de exposição (Marsh e Kinyanjui, 2006; Langhorne *et al.*, 2008; Crompton *et al.*, 2010), o que sugere que a imunidade adquirida contra a malária é de vida curta. Essa perda está associada ao rápido declínio ou a ausência completa dos níveis de anticorpos contra as proteínas da fase sanguínea do parasito. Estudos sugerem que esse declínio de anticorpos seja devido a produção deficiente das células B de memória (MBCs) ou de células plasmáticas de vida longa, uma vez que essas células são responsáveis pela geração de anticorpos (Langhorne *et al.*, 2008). O conhecimento sobre o desenvolvimento e manutenção da imunidade humoral naturalmente adquirida de vida longa é de suma importância no contexto do desenvolvimento de vacinas. Contudo, a escassez de estudos direcionados ao *P. vivax* reforçam a necessidade de trabalhos voltados para esta espécie de plasmódio.

Neste trabalho, foi avaliada a duração da imunidade naturalmente adquirida (anticorpos e MBCs) contra diferentes antígenos de fase sanguínea do *P. vivax*: MSP1-19 e DBPII (variantes e protótipos vacinais) - a principal proteína candidata a vacina de *P. vivax* - em uma população que teve uma única exposição a esse parasito e não foi reexposta em pelo menos 12 anos. Os resultados observados em nosso estudo mostraram que a maioria (> 90%) dos indivíduos com sintomas clínicos da malária na ocasião do surto, foram capazes de desenvolver anticorpos contra a proteína de superfície do merozoíto 1, a MSP1-19, e essa resposta permaneceu estável por até 12 meses. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que mostraram que essa proteína possui elevado potencial imunogênico (Soares e Rodrigues, 2002), podendo induzir a produção de anticorpos capaz de serem detectados por anos no plasma de indivíduos que não estão mais expostos ao *P. vivax* (Braga *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2004; Wipasa *et al.*, 2010).

No caso da DBPII, a resposta de anticorpos foi semelhante entre as variantes avaliadas neste estudo, apresentando uma frequência de aproximadamente 30%, na

época do surto. Ao contrário do observado para MSP1-19, apenas a metade dos indivíduos que desenvolveram anticorpos contra as variantes de DBPII mantiveram a resposta em pelo menos 12 meses do surto de malária. A menor frequência (30%) de respondedores à DBPII, em relação ao observado para MSP1-19 (93%), já era esperado, uma vez que, devido a sua localização em organelas apicais, a DBPII só é exposta ao sistema imune do hospedeiro no momento da invasão de reticulócitos. Isto pode reduzir as chances do sistema imune reconhecer essa proteína e montar uma resposta eficiente (Adams *et al.*, 1990).

A resposta de anticorpos contra MSP1-19 e DBPII ainda foram avaliadas 12 anos após o surto, porém não foi observada resposta para nenhuma das proteínas. A ausência de anticorpos detectáveis 12 anos após o surto de malária em Sousa, para MSP1-19, contrasta com os observados por Braga *et al.* (1998), que descreveu uma frequência positiva de 20% e 47% de resposta contra as proteínas circumsporozoíto (CSP) e MSP1 de *P. vivax*, respectivamente, mesmo após 7 anos o surto de malária ocorrido em uma comunidade rural de Minas Gerais. Este menor tempo para avaliação dos anticorpos (7 anos) pode explicar a presença de anticorpos em indivíduos expostos ao surto avaliado por Braga *et al.* (1998). Além disso, no surto registrado em Sousa, os indivíduos receberam tratamento rápido, o que não permitiu que fosse observado altas parasitemias e longa exposição do parasito ao sistema imune.

Ainda no presente trabalho, avaliamos a resposta de anticorpos contra os protótipos vacinais DEKnull e DEKnull2, que vem sendo desenvolvidos com o objetivo de otimizar a imunogenicidade da DBPII e induzir a produção de anticorpos que sejam capazes de neutralizar a ligação entre diferentes variantes de DBPII ao seu receptor nos reticulócitos (Ntumngia e Adams, 2012). O protótipo DEKnull2 foi mais imunogênico quando comparado ao protótipo DEKnull e as variantes de DBPII, onde observamos níveis de anticorpos mais elevados para DEKnull2, mesmo que a resposta de anticorpos contra este protótipo não tenha sido detectada 12 anos após o surto de malária. Contudo, assim como para a MSP1-19, a resposta de anticorpos para este protótipo vacinal foi estável por 12 meses. Estes fatos indicam que o direcionamento da indução de anticorpos contra epítopos mais conservados e com

capacidade de gerar anticorpos neutralizantes com ampla reatividade a diferentes variantes da DBPII (Chen *et al.*, 2016), são muito promissores.

Apesar de grande parte dos trabalhos disponíveis na literatura mostrarem que a resposta dos anticorpos para malária é de curta duração (Akpogheneta *et al.*, 2008; Crompton *et al.*, 2010), o mesmo não foi mostrado para as células B de memória (MBCs) (Wipasa *et al.*, 2010; Nogaro *et al.*, 2011; Ndungu *et al.*, 2012; Ndungu *et al.*, 2013). Em áreas de baixa transmissão, mesmo após o declínio expressivo de casos de malária, foi observado que pode ocorrer uma rápida indução da produção de anticorpos contra o antígeno da superfície de eritrócitos infectado por trofozoítos jovens (RESA) de *P. falciparum* sendo possível detectar anticorpos contra esta proteína, mesmo após um longo período de tempo sem registrar casos de malária. Estes achados sugerem que a memória imunológica está sendo estabelecida (Migot *et al.*, 1993). De fato, trabalhos têm mostrado que é possível a detecção de células B de memória (MBCs) em indivíduos com histórico de ausência de exposição a esse parasito por até 6 anos (Wipasa *et al.*, 2010; Ndungu *et al.*, 2012). Porém, esses trabalhos não permitem definir a duração das MBCs, uma vez que a transmissão de malária não foi totalmente interrompida nas áreas onde esses trabalhos foram conduzidos. Dessa forma, não se pode descartar presença de infecções assintomáticas ou com parasitemias sub-patentes que possam contribuir para a manutenção das MBCs, já que os indivíduos estão expostos ao parasito. Contudo, um único trabalho mostrou que MBCs específicas para proteínas de *P. falciparum* podem ser detectadas mesmo após 16 anos da exposição única a esse parasito, em indivíduos que viajaram para África e retornaram para a Suécia (Ndungu *et al.*, 2013), apesar dos níveis de anticorpos específicos não serem mais detectados.

No entanto, as observações expostas acima se referem a aquisição da imunidade naturalmente adquirida contra o *P. falciparum*, e o quanto isso pode ser extrapolado para *P. vivax* é pouco conhecido. No que diz respeito ao *P. vivax,* poucos estudos avaliaram a duração da resposta de anticorpos e MBCs específicas. Um estudo realizado por Wipasa *et al.* (2010) em uma área de baixa transmissão de malária no norte da Tailândia, mostraram que anticorpos e MBCs específicas geradas contra as proteínas de *P. vivax* - MSP1-19, AMA-1 e DBP - podem durar por

até 6 anos na ausência de exposição ao parasito. Cabe ressaltar que os indivíduos avaliados neste trabalho foram expostos mais de uma vez ao parasito, o que pode auxiliar na manutenção e estabelecimento da memória adquirida a malária. Além disso, nesta área ocorre a transmissão tanto de *P. vivax* quanto de *P. falciparum*, o que pode contribuir na indução de reação cruzada entre as proteínas expressas por ambos parasitos.

No presente estudo, foi possível mostrar que uma única e curta exposição, (cerca de 50 dias) a somente uma variante de *P. vivax*, foi capaz de induzir MBCs circulantes de longa duração (pelo menos 12 anos) aos antígenos de *P. vivax*. De relevância, os indivíduos expostos foram capazes de gerar e manter MBCs específicas IgG+ circulantes para a MSP1-19 e as variantes de DBPII (Sal-I e BR-1), além de seus protótipos (DEKnull e DEKnull2). Os nossos resultados mostraram que grande parte dos indivíduos expostos (72%) desenvolveram ASCs IgG+ específicas contra MSP1-19. Esses dados corroboram com os achados de Ndungu *et al.* (2013), onde foi descrito que indivíduos expostos uma única vez ao *P. falciparum* foram capazes de manter MBCs por até 16 anos específicas para MSP1.

Entre as variantes de DBPII avaliadas, a DBPII BR-1 foi a que mostrou melhores resultados, apresentando maior frequência de resposta quando comparada com DBPII Sal-I. A análise da sequência de aminoácidos presentes na região do ligante da variante BR-1 nos mostrou que esta variante se assemelha mais a variante presente no surto, quando comparada a variante DBPII Sal-I (Ceravolo *et al.*, 2009). Esse fato pode explicar a maior frequência de respondedores observado para BR-1 e reforçam a natureza variante-específica da resposta de anticorpos contra a DBPII (Ceravolo *et al.*, 2009; Cole-Tobian *et al.*, 2009).

Além das variantes de DBPII -- Sal-I e BR-1 -- avaliamos a produção de ASCs IgG+ contra os protótipos vacinais DEKnull e DEKnull2. Os resultados nos mostram que o protótipo DEKnull foi pouco imunogênico, apresentando a menor frequência de MBCs entre todas as proteínas avaliadas. A baixa resposta (tanto de anticorpos quanto de MBCs) encontrada para DEKnull corrobora com os achados que descrevem uma baixa imunogenicidade desse protótipo quando comparada a outras variantes de DBPII (Ntumngia *et al.*, 2013). Contudo, de forma animadora,

observamos que a frequência de MBCs para DEKnull2 foi a maior entre as construções de DBPII avaliadas, inclusive quando comparado com DBPII BR-1. Esses resultados animadores evidenciam o potencial imunogênico desse protótipo e reforçam seu potencial como candidato à vacina contra o *P. vivax*.

Nossos resultados mostraram também que, indivíduos expostos ao surto, mas que não apresentaram sintomas, não-caso, foram capazes de apresentar MBCs IgG+ contra todas as proteínas avaliadas. Uma vez que, na ocasião do surto apenas os indivíduos que apresentaram sintomas clínicos foram submetidos ao diagnóstico laboratorial, realizado por microscopia, e tratamento, não podemos descartar que esses indivíduos tenham sido infectados no momento do surto. Dessa forma, não excluímos a possibilidade de infecções assintomáticas terem ocorrido. Embora infecções assintomáticas não sejam comuns em indivíduos sem prévia exposição, como é o caso dos indivíduos do surto, não podemos desconsiderar a presença de mecanismos inatos de resistência a malária como, por exemplo, anemia falciforme e talassemia, (Teo e Wong, 1985; Allen *et al.*, 1997; Lelliott *et al.*, 2015), e estes fatores não foram avaliados na população estudada.

Na tentativa de conhecer melhor os aspectos do desenvolvimento e duração da resposta naturalmente adquirida, estudos tem mostrado que as subpopulações de MBCs são mais diversas do que pensávamos conhecer até o momento, tanto em humanos, quanto em camundongos (Dogan *et al.*, 2009; Pape *et al.*, 2011). Nesse contexto, um trabalho recente mostrou que, camundongos após serem infectados e posteriormente desafiados com a proteína MSP1, tendem a ter suas MBCs diferenciadas em ASCs específicas IgM+ de forma mais rápida e mais robusta que MBCs IgG+ (Krishnamurty *et al.*, 2016). Diante disso, avaliamos se a população de estudo (surto em Sousa-MG) seria capaz de produzir ASCs IgM+ específicas às mesmas proteínas de *P. vivax* avaliadas ao longo desse trabalho. Dessa forma, mostramos que indivíduos expostos uma única vez ao *P. vivax* produzem ASC IgM+ específicas para as variantes de DBPII, Sal-I e BR-1, além do protótipo vacinal DEKnull2. Além disso, esses resultados mostraram que, ASCs IgM+ possuem amplitude de resposta maior quando comparadas às ASC IgG+ frente a DBPII e ao protótipo vacinal DEKnull2. Estes resultados deixam claro que a resposta imune frente a uma reexposição a antígenos da malária pode seguir vias diversas de

diferenciação celular e conhecê-las é fundamental para o desenvolvimento de uma vacina eficiente.

Já é conhecido que a exposição ao plasmódio altera o balanço entre as subpopulações de células B com expansão das MBCs atípicas (Weiss *et al.*, 2009; Illingworth *et al.*, 2013; Requena *et al.*, 2014; Portugal *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2015). Portanto, embora a nossa população de estudo tenha sido exposta uma única vez ao *P. vivax*, nós avaliamos se o balanço entre as MBCs estava alterado. Como esperado, não observamos alteração significativa no balanço entre as MBCs, nem mesmo entre as MBCs B atípicas e clássicas. Nossos resultados estão de acordo com Ndungu *et al.* (2013) que mostram que uma única exposição ao *P. falciparum* também não levou a alteração no balanço de MBCs e nem a expansão de MBCs atípicas. De fato, a expansão de MBCs atípicas só foi observada em populações com histórico de exposição contínua ao *P. falciparum* e *P. vivax* (Portugal *et al.*, 2013; Requena *et al.*, 2014).

6. 2 Exposição contínua à malária induz alteração no balanço de células B, mas não altera a resposta de anticorpos

Estudos têm mostrado que a infecção ou exposição contínua à malária causa um aumento das MBCs atípicas tanto em população exposta ao *P. falciparum* como pelo *P. vivax* (Weiss *et al.*, 2009; Illingworth *et al.*, 2013; Requena *et al.*, 2014; Portugal *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2015). Portanto, nosso grupo teve o propósito de conhecer a resposta imune humoral naturalmente adquirida em indivíduos sob exposição contínua ao parasito da malária humana, tanto em indivíduos com malária aguda quanto sem malária. Mais especificamente, verificamos se a exposição continua à malária promove a alteração de balanço de células B e alteração na resposta de anticorpos aos antígenos de *P. vivax*.

De fato, os resultados do presente trabalho mostraram que o acúmulo de exposição à malária é capaz de aumentar a proporção de MBCs atípicas, tanto em indivíduos com infecção pelo *P. vivax* quanto em indivíduos sem infecção aguda. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que mostraram que o aumento das MBCs atípicas tem correlação positiva com o aumento da exposição e

intensidade de transmissão de malária (Weiss *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2011). Embora até pouco tempo a função dessas células não estivesse bem estabelecida, evidências demonstraram que as MBCs atípicas podem estar envolvidas no desenvolvimento de resposta imune deficiente para malária, como a geração de anticorpos e células B de memória de curta duração (Weiss *et al.*, 2009; Illingworth *et al.*, 2013; Requena *et al.*, 2014; Portugal *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2015).

No que diz respeito a resposta de anticorpos, o acompanhamento por 12 meses de indivíduos expostos à malária e não infectados pelo *P. vivax*, mostrou que a frequência de respondedores para MSP1-19 foi maior entre as proteínas aqui avaliadas, além de ter sido estável durante o período estudado. Esses resultados já eram esperados, uma vez que, vários trabalhos mostram que a MSP1 é capaz de gerar uma resposta de alta reatividade em indivíduos com histórico de exposição recente ao *P. vivax* (Soares *et al.*, 1997; Soares e Rodrigues, 2002).

No caso da resposta de anticorpos contra as variantes de DBPII e protótipos vacinais DEKnull e DEKnull2, a frequência de respondedores para essas proteínas foi similar. Entretanto, o protótipo DEKnull2 foi mais imunogênico comparado as variantes DBPII Sal-I e BR-1, com os níveis de anticorpos mais altos. Além disso, resultados preliminares com a DEKnull2 mostraram que este protótipo é bastante imunogênico, tanto em camundongos quanto em humanos, sendo capaz de induzir produção de anticorpos bloqueadores da interação DBPII e o receptor nos reticulócitos, e com ampla reatividade comparado às diferentes variantes de DBPII (dados não publicados). Esses fatos reforçam a DEKnull2 como um candidato à vacina em potencial contra *P. vivax*.

Estudos prévios apontam que indivíduos com exposição continua à malária apresentam alteração do balanço de MBCs com expansão de células atípicas (Weiss *et al.*, 2009; Illingworth *et al.*, 2013; Requena *et al.*, 2014; Portugal *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2015), que a malária causa uma desregulação da resposta de células B. Por isso, nosso próximo passo foi verificar se indivíduos sem nenhuma reposta de anticorpos (não-respondedores) ou que apresentaram anticorpos por 12 meses a todas as variantes de DBPII aqui avaliadas (respondedores), apresentavam diferenças entre a frequência das subpopulações de células B. Não foi encontrada

diferença significativa entre as frequências de subpopulações de células B nos grupos avaliados. Porém, o número restrito de indivíduos (n=4) identificados como respondedores pode ter sido uma limitação. Além disso, desses indivíduos apenas dois apresentaram anticorpos bloqueadores, ou seja, capaz de bloquear a interação entre a DBPII e seu receptor DARC. Dessa forma, mais experimentos que incluam um número maior de indivíduos respondedores à DBPII com anticorpos bloqueadores são necessários para a robustez dos resultados. Assim, os achados aqui apresentados de expansão de MBCs atípica, nos auxiliarão a conduzir os próximos passos deste trabalho, onde pretendemos entender o desenvolvimento, manutenção e estabilidade da resposta imune adquirida em indivíduos expostos ao *P. vivax.*

7 CONCLUSÃO

- Anticorpos gerados contra os antígenos de fase sanguínea de *P. vivax*, contemplados neste trabalho, após uma única exposição, tendem a ser de vida curta;
- Ao contrário dos anticorpos, as MBCs são mantidas por longo tempo (pelo menos 12 anos), mesmo na ausência de uma reexposição ao parasito;
- A resposta de MBCs durante uma reativação mostra que ASCs IgM+ se diferenciam e respondem em maior amplitude que as MBCs IgG+. Esses resultados reforçam que MBCs IgM+ podem ter um papel subestimado na manutenção da memória imunológica;
- Uma única exposição ao *P. vivax* e após 12 anos, não ocasiona o aumento da frequência de MBCs B atípicas;
- DEKnull2, um protótipo vacinal baseado em DBPII, se mostrou naturalmente imunogênico em indivíduos expostos uma única vez ao *P. vivax* e foi capaz de ser reconhecido tanto por ASCs IgM+ e ASCs IgG+, reforçando o papel promissor como candidato à vacina contra *P. vivax*.
- Residentes em área endêmica para malária, com ou sem malária aguda pelo *P. vivax*, apresentam maior frequência de MBCs atípicas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. H. et al. The Duffy receptor family of Plasmodium knowlesi is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell,** v. 63, n. 1, p. 141-53, Oct 05 1990.

ADAMS, J. H. et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 89, n. 15, p. 7085-9, Aug 01 1992.

AKPOGHENETA, O. J. et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific. **Infect Immun,** v. 76, n. 4, p. 1748-55, Apr 2008.

ALEXANDRE, M. A. et al. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis,** v. 16, n. 10, p. 1611-4, Oct 2010.

ALLEN, S. J. et al. alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 94, n. 26, p. 14736-41, Dec 23 1997.

ARAMA, C. et al. Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a Broad Array of Plasmodium falciparum Antigens. **Open Forum Infect Dis,** v. 2, n. 3, p. ofv118, Sep 2015.

BEESON, J. G. et al. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. **FEMS Microbiol Rev,** v. 40, n. 3, p. 343-72, May 2016.

BOYLE, M. J. et al. Human antibodies fix complement to inhibit Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity,** v. 42, n. 3, p. 580-90, Mar 17 2015.

BRAGA, E. M. et al. Association of the IgG response to Plasmodium falciparum merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. **Am J Trop Med Hyg,** v. 66, n. 5, p. 461-6, May 2002.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to Plasmodium vivax. **J Infect Dis,** v. 177, n. 4, p. 1132-5, Apr 1998.

CAMARGO, L. M. et al. Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. **Am J Trop Med Hyg,** v. 51, n. 1, p. 16-25, Jul 1994.

CERÁVOLO, I. P. **Caracterização Imunológica e Molecular da Duffy Binding Protein do Plasmodium vivax em Áreas de Transmissão de Malária da Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira** 2007. 132 Programa de Pós Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, Brasil.

CERAVOLO, I. P. et al. 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. 675-81, Jun 2005.

CERAVOLO, I. P. et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clin Exp Immunol,** v. 156, n. 3, p. 502-10, Jun 2009.

CERAVOLO, I. P. et al. 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. 270-8, Mar 2008.

CERBINO, V. D. A. et al. **Evolução e Controle Do Surto De Malária Por *Plasmodium vivax* Em Rio Manso, Minas Gerais, 2003** Brasil: Revista Brasileira de Medicina Tropical 2004.

CHAN, J. A.; FOWKES, F. J.; BEESON, J. G. Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. **Cell Mol Life Sci,** v. 71, n. 19, p. 3633-57, Oct 2014.

CHARLES, E. D. et al. Clonal expansion of immunoglobulin M+CD27+ B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. **Blood,** v. 111, n. 3, p. 1344-56, Feb 01 2008.

CHAVES, K. M. **Malária em Minas Gerais, Brasil, situação 2007 a 2012**. GERAIS, S.-S. D. E. D. S. D. M. Brasil 2013.

_____. **Ocorrência de casos de Malária na região de garimpo Areinha , SRS de Diamantina, Minas Gerais, 2016** GERAIS, S. D. E. D. S. D. M. Brasil 2017.

CHEN, E. et al. Broadly neutralizing epitopes in the Plasmodium vivax vaccine candidate Duffy Binding Protein. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 113, n. 22, p. 6277-82, May 31 2016.

CHITNIS, C. E.; MILLER, L. H. Identification of the erythrocyte binding domains of Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi proteins involved in erythrocyte invasion. **J Exp Med,** v. 180, n. 2, p. 497-506, Aug 01 1994.

CHOOTONG, P. et al. Mapping epitopes of the Plasmodium vivax Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. **Infect Immun,** v. 78, n. 3, p. 1089-95, Mar 2010.

CHOOTONG, P. et al. Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: approach to Plasmodium vivax vaccine development in Thailand. **PLoS One,** v. 7, n. 4, p. e35769, 2012.

COHEN, S.; BUTCHER, G. A.; CRANDALL, R. B. Action of malarial antibody in vitro. **Nature,** v. 223, n. 5204, p. 368-71, Jul 26 1969.

COHEN, S.; MC, G. I.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature,** v. 192, p. 733-7, Nov 25 1961.

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. 121-32, Apr 03 2003.

COLE-TOBIAN, J. L. et al. Age-acquired immunity to a Plasmodium vivax invasion ligand, the duffy binding protein. **J Infect Dis,** v. 186, n. 4, p. 531-9, Aug 15 2002.

COLE-TOBIAN, J. L. et al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous plasmodium vivax strains in Papua New Guinean children. **Infect Immun,** v. 77, n. 9, p. 4009-17, Sep 2009.

CROMPTON, P. D. et al. A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 107, n. 15, p. 6958-63, Apr 13 2010.

CROMPTON, P. D. et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annu Rev Immunol,** v. 32, p. 157-87, 2014.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine,** v. 20, n. 3-4, p. 385-96, Nov 12 2001.

DA SILVA-NUNES, M. et al. 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. 624-35, Oct 2008.

DE CASTRO, M. C. et al. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 103, n. 7, p. 2452-7, Feb 14 2006.

DE PINA-COSTA, A. et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 109, n. 5, p. 618-33, Aug 2014.

DE SOUSA, T. N. et al. The Duffy binding protein as a key target for a Plasmodium vivax vaccine: lessons from the Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 109, n. 5, p. 608-17, Aug 2014.

DOGAN, I. et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. **Nat Immunol,** v. 10, n. 12, p. 1292-9, Dec 2009.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malar J,** v. 15, n. 1, p. 284, May 20 2016.

FONTES, C. J.; BATHURST, I.; KRETTLI, A. U. Plasmodium vivax sporozoite antibodies in individuals exposed during a single malaria outbreak in a non-endemic area. **Am J Trop Med Hyg,** v. 44, n. 1, p. 28-33, Jan 1991.

FOWKES, F. J.; BOEUF, P.; BEESON, J. G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. **Parasitology,** v. 143, n. 2, p. 139-53, Feb 2016.

GHANI, A. C. et al. Loss of population levels of immunity to malaria as a result of exposure-reducing interventions: consequences for interpretation of disease trends. **PLoS One,** v. 4, n. 2, p. e4383, 2009.

GRIMBERG, B. T. et al. Plasmodium vivax invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. **PLoS Med,** v. 4, n. 12, p. e337, Dec 2007.

HAGA, C. L. et al. Fc receptor-like 5 inhibits B cell activation via SHP-1 tyrosine phosphatase recruitment. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 23, p. 9770-5, Jun 05 2007.

HILL, D. L. et al. Opsonising antibodies to P. falciparum merozoites associated with immunity to clinical malaria. **PLoS One,** v. 8, n. 9, p. e74627, 2013.

HOLDER, A. A. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. **Parasitology,** v. 136, n. 12, p. 1445-56, Oct 2009.

HOLZ, L. E.; FERNANDEZ-RUIZ, D.; HEATH, W. R. Protective immunity to liver-stage malaria. **Clin Transl Immunology,** v. 5, n. 10, p. e105, Oct 2016.

ILLINGWORTH, J. et al. Chronic exposure to Plasmodium falciparum is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. **J Immunol,** v. 190, n. 3, p. 1038-47, Feb 01 2013.

JAHNMATZ, M. et al. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. **J Immunol Methods,** v. 391, n. 1-2, p. 50-9, May 31 2013.

KANO, F. S. et al. Plasmodium vivax Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Trop Med Int Health,** v. 17, n. 8, p. 989-1000, Aug 2012.

KING, C. L. et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 105, n. 24, p. 8363-8, Jun 17 2008.

KOEPFLI, C. et al. 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.

KRISHNAMURTY, A. T. et al. Somatically Hypermutated Plasmodium-Specific IgM(+) Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. **Immunity,** v. 45, n. 2, p. 402-14, Aug 16 2016.

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

LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat Immunol,** v. 9, n. 7, p. 725-32, Jul 2008.

LAPOUBLE, O. M.; SANTELLI, A. C.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. [Epidemiological situation of malaria in the brazilian amazon region, 2003 to 2012]. **Rev Panam Salud Publica,** v. 38, n. 4, p. 300-6, Oct 2015.

LELLIOTT, P. M. et al. The influence of host genetics on erythrocytes and malaria infection: is there therapeutic potential? **Malar J,** v. 14, p. 289, Jul 29 2015.

LIM, K. J. et al. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to Plasmodium vivax. **Parasitol Res,** v. 92, n. 5, p. 384-9, Mar 2004.

LIMONGI, J. E. et al. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 41, n. 3, p. 232-7, May-Jun 2008.

LIN, E. et al. 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, Feb 04 2010.

LONGLEY, R. J.; SATTABONGKOT, J.; MUELLER, I. Insights into the naturally acquired immune response to Plasmodium vivax malaria. **Parasitology,** v. 143, n. 2, p. 154-70, Feb 2016.

LORENZ, C. et al. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. **Malar J,** v. 14, p. 408, Oct 15 2015.

MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunol,** v. 28, n. 1-2, p. 51-60, Jan-Feb 2006.

MEIBALAN, E.; MARTI, M. Biology of Malaria Transmission. **Cold Spring Harb Perspect Med**, Nov 11 2016.

MIGOT, F. et al. Anti-malaria antibody-producing B cell frequencies in adults after a Plasmodium falciparum outbreak in Madagascar. **Clin Exp Immunol,** v. 102, n. 3, p. 529-34, Dec 1995.

MIGOT, F. et al. Human immune responses to the Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf155/RESA) after a decrease in malaria transmission in Madagascar. **Am J Trop Med Hyg,** v. 48, n. 3, p. 432-9, Mar 1993.

MILLER, L. H. et al. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **N Engl J Med,** v. 295, n. 6, p. 302-4, Aug 05 1976.

MOIR, S. et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. **J Exp Med,** v. 205, n. 8, p. 1797-805, Aug 04 2008.

MUELLENBECK, M. F. et al. Atypical and classical memory B cells produce Plasmodium falciparum neutralizing antibodies. **J Exp Med,** v. 210, n. 2, p. 389-99, Feb 11 2013.

MUELLER, I. et al. Natural acquisition of immunity to Plasmodium vivax: epidemiological observations and potential targets. **Adv Parasitol,** v. 81, p. 77-131, 2013.

MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for Plasmodium vivax malaria. **Vaccine,** v. 33, n. 52, p. 7489-95, Dec 22 2015.

NDUNGU, F. M. et al. Long-lived Plasmodium falciparum specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. **Eur J Immunol,** v. 43, n. 11, p. 2919-29, Nov 2013.

NDUNGU, F. M. et al. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 109, n. 21, p. 8247-52, May 22 2012.

NICOLETE, V. C. et al. 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, Nov 15 2016.

NJAU, M. N.; JACOB, J. The enigma of memory B cells in malaria. **Eur J Immunol,** v. 42, n. 12, p. 3146-9, Dec 2012.

NOBREGA DE SOUSA, T.; CARVALHO, L. H.; ALVES DE BRITO, C. F. Worldwide genetic variability of the Duffy binding protein: insights into Plasmodium vivax vaccine development. **PLoS One,** v. 6, n. 8, p. e22944, 2011.

NOGARO, S. I. et al. The breadth, but not the magnitude, of circulating memory B cell responses to P. falciparum increases with age/exposure in an area of low transmission. **PLoS One,** v. 6, n. 10, p. e25582, 2011.

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. 30-6, Jan 2012.

NTUMNGIA, F. B. et al. Immunogenicity of a synthetic vaccine based on Plasmodium vivax Duffy binding protein region II. **Clin Vaccine Immunol,** v. 21, n. 9, p. 1215-23, Sep 2014.

NTUMNGIA, F. B. et al. Conserved and variant epitopes of Plasmodium vivax Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. **Infect Immun,** v. 80, n. 3, p. 1203-8, Mar 2012.

NTUMNGIA, F. B. et al. Immunogenicity of single versus mixed allele vaccines of Plasmodium vivax Duffy binding protein region II. **Vaccine,** v. 31, n. 40, p. 4382-8, Sep 13 2013.

O'DONNELL, R. A. et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **J Exp Med,** v. 193, n. 12, p. 1403-12, Jun 18 2001.

PAHO. **Report on the Situation of Malaria in the Americas 2014**. Washington, D.C: Pan American Health Organization 2016.

PAPE, K. A. et al. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. **Science,** v. 331, n. 6021, p. 1203-7, Mar 04 2011.

PARK, J. W. et al. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of Plasmodium vivax in Korea. **Clin Diagn Lab Immunol,** v. 8, n. 1, p. 14-20, Jan 2001.

PATARROYO, M. A.; CALDERON, D.; MORENO-PEREZ, D. A. Vaccines against Plasmodium vivax: a research challenge. **Expert Rev Vaccines,** v. 11, n. 10, p. 1249-60, Oct 2012.

PENIDO, A. **Brasil registra o menor número de casos de malária nos últimos 35 anos** Portal da Saúde 2016.

PETTER, M.; DUFFY, M. F. Antigenic Variation in Plasmodium falciparum. **Results Probl Cell Differ,** v. 57, p. 47-90, 2015.

PHIMPRAPHI, W. et al. Longitudinal study of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in a Karen population in Thailand. **Malar J,** v. 7, p. 99, Jun 02 2008.

PORTUGAL, S. et al. B cell analysis of ethnic groups in Mali with differential susceptibility to malaria. **Malar J,** v. 11, p. 162, May 11 2012.

PORTUGAL, S.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. Young lives lost as B cells falter: what we are learning about antibody responses in malaria. **J Immunol,** v. 190, n. 7, p. 3039-46, Apr 01 2013.

PORTUGAL, S. et al. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. **Elife,** v. 4, May 08 2015.

PRICE, R. N. et al. Vivax malaria: neglected and not benign. **Am J Trop Med Hyg,** v. 77, n. 6 Suppl, p. 79-87, Dec 2007.

REQUENA, P. et al. Pregnancy and malaria exposure are associated with changes in the B cell pool and in plasma eotaxin levels. **J Immunol,** v. 193, n. 6, p. 2971-83, Sep 15 2014.

RODRIGUES, M. H. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. **Int J Parasitol,** v. 35, n. 2, p. 185-92, Feb 2005.

SABCHAREON, A. et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **Am J Trop Med Hyg,** v. 45, n. 3, p. 297-308, Sep 1991.

SAÚDE, M. D. **Guia da Vigilância Epidemiológica** EPIDEMIOLÓGICA, D. D. V. Brasília Secretaria de Vigilância em Saúde. 7**:** 31 - 54 p. 2009.

_____. **Boletim epidemiológico. Malária: Monitoramento do casos no Brasil em 2014**. SAÚDE, S. D. V. E. Brasil. 46 2015a.

_____. **Boletim epidemiológico. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 e 2013**. SAÚDE, S. D. V. E. Brasil. 46 2015b.

SAÚDE, S. D. V. E. **Boletim eletrônico Epidemiológico**. SAÚDE, M. D. Brasil: Núcleo de Comunicação da Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. 10 2010.

SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; RIVIERE, L. Antigenic variation in Plasmodium falciparum. **Annu Rev Microbiol,** v. 62, p. 445-70, 2008.

SINDEN, R. E. Sexual development of malarial parasites. **Adv Parasitol,** v. 22, p. 153-216, 1983.

SOARES, I. S. et al. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. **Am J Trop Med Hyg,** v. 60, n. 3, p. 357-63, Mar 1999.

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

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from Pichia pastoris. **Parasitology,** v. 124, n. Pt 3, p. 237-46, Mar 2002.

SOUSA, T. N. et al. 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, Nov 22 2010.

SOUZA-SILVA, F. A. et al. Naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg,** v. 82, n. 2, p. 185-93, Feb 2010.

SOUZA-SILVA, F. A. et al. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity. **PLoS One,** v. 9, n. 4, p. e93782, 2014.

STRUIK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunol Rev,** v. 201, p. 268-90, Oct 2004.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science,** v. 313, n. 5791, p. 1287-90, Sep 01 2006.

SULLIVAN, R. T. et al. FCRL5 Delineates Functionally Impaired Memory B Cells Associated with Plasmodium falciparum Exposure. **PLoS Pathog,** v. 11, n. 5, p. e1004894, May 2015.

TAKALA, S. L.; PLOWE, C. V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. **Parasite Immunol,** v. 31, n. 9, p. 560-73, Sep 2009.

TEO, C. G.; WONG, H. B. The innate resistance of thalassaemia to malaria: a review of the evidence and possible mechanisms. **Singapore Med J,** v. 26, n. 7, p. 504-9, Dec 1985.

TONGREN, J. E. et al. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. **Infect Immun,** v. 74, n. 1, p. 257-64, Jan 2006.

TSUBOI, T. et al. Natural variation within the principal adhesion domain of the Plasmodium vivax duffy binding protein. **Infect Immun,** v. 62, n. 12, p. 5581-6, Dec 1994.

TYLER, J. S.; TREECK, M.; BOOTHROYD, J. C. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. **Trends Parasitol,** v. 27, n. 9, p. 410-20, Sep 2011.

VERSIANI, F. G. et al. High levels of IgG3 anti ICB2-5 in Plasmodium vivax-infected individuals who did not develop symptoms. **Malar J,** v. 12, p. 294, Aug 27 2013.

VICENTIN, E. C. et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 expressed in Pichia pastoris yeast. **Infect Immun,** v. 82, n. 3, p. 1296-307, Mar 2014.

WEISS, G. E. et al. A positive correlation between atypical memory B cells and Plasmodium falciparum transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. **PLoS One,** v. 6, n. 1, p. e15983, Jan 14 2011.

WEISS, G. E. et al. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. **J Immunol,** v. 183, n. 3, p. 2176-82, Aug 01 2009.

WEISS, G. E. et al. The Plasmodium falciparum-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. **PLoS Pathog,** v. 6, n. 5, p. e1000912, May 20 2010.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. **Malar J,** v. 10, p. 297, Oct 11 2011.

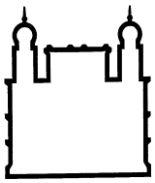
WHO. **World Malaria Report**. Geneva 2016.

WIPASA, J. et al. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **PLoS Pathog,** v. 6, n. 2, p. e1000770, Feb 19 2010.

ZINOCKER, S. et al. The V gene repertoires of classical and atypical memory B cells in malaria-susceptible West African children. **J Immunol,** v. 194, n. 3, p. 929-39, Feb 01 2015.

ZUMPANO, J. F. et al. **Estudo Das Recaídas No Surto De Malária Por *Plasmodium Vivax* No Distrito De Sousa, Município de Rio Manso, Minas Gerais, Brasil**. Brasil: Revista de Brasileira de Medicina Tropical 2004.

ANEXO 1- Questionário aplicado aos indivíduos participantes do estudo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Malária

Data ____/____/_____

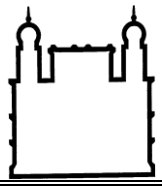
Paciente N^0 _____
Nome _____
Idade_____ Sexo (1) F (2) M Cor (1) branca (2) parda (3) negra
Município de Residência _____
Endereço_____
Telefone de contato _____

No momento da coleta:
Malária aguda (1) sim (2) não (3) duvidoso Espécie: _____
Optimal realizado? (1) sim (2) não Resultado (1) positivo (2) negativo (3) duvidoso
Resultado da lâmina: _____ parasitemia_____

Você teve malária (1) sim (2) não (3) duvidoso
Quantas vezes? _____
Espécie da última malária? (1) *P.vivax* (2) *P.falciparum* (3) não sabe (9) não se aplica
Quando foi sua última malária?_____
Teve Sintomas (1) sim (2) não Quais?_____
Você concluiu o tratamento (1) sim (2) não (3) não sabe (9) não se aplica
Há quanto tempo_____
Você chegou a ser hospitalizado por malária? (1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica
Se sim, por quanto tempo?_____
Município de contágio?_____
Como você pegou malária?_____
Você reside nessa área? (1) Sim (2) Não

Há quantos anos você reside nessa área?_____
Apresentou nos últimos cinco anos, alguma doença grave?
(1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica
Se sim, qual?_____
Está gripado ou com alguma infecção?
(1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica
Sinais/sintomas?_____
Está fazendo uso de algum medicamento?
(1) Sim (2) Não (3) Não sabe
Se sim, qual?_____
Se sim, há quanto tempo_____
Você sabe como transmite a malária?_____
Obs:_____
_____

ANEXO 2- Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes do estudo



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou

Laboratório de Malária

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa sobre a "**Avaliação da imunidade natural de longa-duração à proteínas recombinantes do *Plasmodium vivax* que estão envolvidas na invasão e/ou desenvolvimento do parasito no eritrócito"**, que será coordenado pela Dra. Luzia Helena Carvalho, pesquisadora do Centro de pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ) de Belo Horizonte, Minas Gerais

Você foi selecionado para participar deste projeto de pesquisa porque reside na comunidade de Sousa, Distrito de Rio Manso, onde aconteceu um surto de malária (doença transmitida pela picada de mosquitos) em 2003. Mais especificamente, você ou alguém da sua família teve a doença naquela ocasião. Entretanto, sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a equipe da pesquisa ou com a Instituição.

O objetivo deste estudo é saber se o seu sistema imune (que é a parte do seu corpo que é responsável por combater os micróbios) ainda lembra que você teve a doença (esta lembrança do seu organismo é chamada de memória). Isto é importante para saber se as vacinas que estão sendo desenvolvidas podem ser eficientes para induzir esta memória (sem isto as vacinas podem não ser protetoras contra a doença).

Caso você aceite participar, a sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário onde constam perguntas, tais como, sua idade, se teve ou não a doença na época, se visitou áreas da Amazônia (onde existe a doença). Além disto iremos coletar o seu sangue. Vamos coletar cerca de 3 tubos de sangue (10 ml cada, isto é, cada tubo corresponde a cerca de uma colher de sopa de sangue). Esta quantidade de sangue retirada não causa nenhum problema a sua saúde. A coleta de sangue vai ser realizada com tubos descartáveis e todo o material também é descartável, incluindo agulhas e as luvas usadas pela nossa equipe de pesquisa. A coleta de sangue pode gerar um certo desconforto no momento da picada da agulha e existe a possibilidade de formação de um "rouxidão" no local da punção. Entretanto, todas as providências serão tomadas para diminuir ao máximo estas possibilidades. Nossa equipe sabe coletar bem o sangue e tem muita experiência nisto. Além do material ser descartável nós vamos limpar bem a sua pela com álcool (fazer assepsia), no local da picada, para evitar a possibilidade de contaminação no momento da coleta. Caso a coleta de sangue deixe uma rouxidão no seu braço, este efeito é temporário e não vai ficar muito tempo no seu braço. Mas, caso esta coleta de sangue leve a algum dano permanente em você, nós vamos indenizá-lo de acordo com os temos legais vigentes no Brasil

Você ou sua comunidade não terão nenhum benefício direto e imediato relacionado a esta pesquisa. Mas, a sua contribuição neste estudo é importante porque este estudo poderá

contribuir para o desenvolvimento futuro de uma vacina contra a malária. Você também poderá ter acesso aos resultados da nossa pesquisa. Para isto basta que entre em contato conosco e nós podemos lhe explicar os resultados pessoalmente, por escrito ou por telefone.

O material que sobrar do seu sangue, nós estamos pedindo a sua autorização para não jogar fora, mas guardar apropriadamente no nosso laboratório. Este material (resto do seu sangue) será mantido a baixas temperaturas para ser conservado e poderá ser usado em pesquisas futuras relacionadas a este projeto. Caso nós decidirmos fazer outro projeto de pesquisa, nós voltaremos e iremos pedir novamente a sua autorização para usar o sangue estocado. Quando isto acontecer você poderá aceitar ou não que utilizaremos o seu sangue guardado. Você será sempre o dono da sua amostra guardada no nosso laboratório e nós seremos apenas os guardiões e vamos cuidar para que esta amostra de sangue seja bem preservada ao longo dos anos. A qualquer momento também você poderá nos solicitar que não guarde mais o material proveniente do seu sangue. Neste caso, nos descartaremos apropriadamente a sua amostra..

As suas informações obtidas mediante essa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua identidade Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, sendo o seu sangue e os dados obtidos identificadas com um código, conhecido somente pelo responsável por esta pesquisa.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta os telefones e o endereço institucional do coordenador desta pesquisa (Dra. Luzia Helena Carvalho) e do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da nossa instituição (Dr. Naftale Katz, Presidente), e você poderá a qualquer momento nos ligar para tirar suas dúvidas sobre sua participação, esta pesquisa ou a doença.

_____

Luzia Helena Carvalho
Coordenadora do Projeto
Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz-MG
Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, CEP: 30190-002 Belo Horizonte
Fone (31) 3349-7793 / (31) 91974144
Comitê de Ética, Presidente, Dr. Naftale Katz: (31) 3349-7825

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Sousa, _____ de _____ de 20__

_____

Nome do voluntário da pesquisa

_____Assinatura do voluntário