

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E  
MEDICINA TROPICAL

**Raianna Farhat Fantin**

**Identificação, caracterização e determinação de padrões da resposta imune de  
epítomos imunogênicos de *Plasmodium vivax***

Belo Horizonte  
2023

**RAIANNA FARHAT FANTIN**

**Identificação, caracterização e determinação de padrões da resposta imune de epítomos imunogênicos de *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Área de concentração: Imunologia e doenças infecciosas e tropicais.

Orientadora: Dra. Lilian Lacerda Bueno

**Belo Horizonte  
2023**

F216i

Fantin, Raianna Farhat.

Identificação, caracterização e determinação de padrões de resposta

imune de epítomos imunogênicos de *Plasmodium vivax* [recursos eletrônicos]. / Raianna Farhat Fantin. - - Belo Horizonte: 2023.

123f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Lilian Lacerda Bueno.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de

Medicina.

1. Malária. 2. *Plasmodium vivax*. 3. Imunidade Humoral. 4. Epítomos. 5. Dissertação Acadêmica. I. Bueno, Lilian Lacerda. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WC 765

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**"IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PADRÕES DA RESPOSTA IMUNE DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS DE PLASMODIUM VIVAX"**

**RAIANNA FARHAT FANTIN**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 05 de maio de 2023, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

**PROFA. LUCIANE MORENO STORTI DE MELO**

UFS

**PROFA. STEFANIE COSTA PINTO LOPES**

FIOCRUZ

**PROF. JOSUE DA COSTA LIMA JUNIOR**

IOC/FIOCRUZ

**PROF. GREGÓRIO GUILHERME ALMEIDA**

INSTITUTO RENÉ RACHOU - FIOCRUZ - MINAS

**PROFA. LILIAN LACERDA BUENO** - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 05 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Josué da Costa Lima Junior, Usuário Externo**, em 05/05/2023, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gregório Guilherme Almeida, Usuário Externo**, em 05/05/2023, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Moreno Storti de Melo, Usuária Externa**, em 05/05/2023, às 13:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefanie Costa Pinto Lopes, Usuária Externa**, em 05/05/2023, às 13:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Lacerda Bueno, Professora do Magistério Superior**, em 08/05/2023, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2262843** e o código CRC **DED95870**.

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**REITORA:** Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

**VICE-REITOR:** Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

**PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO:** Prof. Dr. Fábio Alves da Silva Júnior

**PRÓ-REITOR DE PESQUISA:** Prof. Dr. Mário Fernando Montenegro Campos

### **FACULDADE DE MEDICINA**

**DIRETORA:** Profa. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

**VICE-DIRETORA:** Profa. Dra. Cristina Gonçalves Alvim

**COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Prof. Dr. Tarcizo Afonso  
Nunes

**SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Prof. Dr. Eli Iola  
Gurgel Andrade

### **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

**Área de concentração:** Imunologia das doenças infecciosas e tropicais

**COORDENADOR:** Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

**SUBCOORDENADOR:** Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Junior

### **MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO**

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Prof. Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Prof. Dra. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Unaí Tupinambás

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Junior

**Representante discente:** Camila Simões de Freitas

## Raianna Farhat Fantin

---

Esta tese foi desenvolvida nas dependências da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), especificamente no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos (LICP) sob orientação da Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno. Houve período sanduíche no *National Institutes of Health* (Maryland, USA), no *Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology* (NIAD) sob orientação do Dr. Patrick E. Duffy e da Dra. Camila H. Coelho. Os trabalhos de campo e coleta de amostras foram realizados nas dependências do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) em Porto Velho (RO, Brasil).

### Colaboradores

#### **Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG**

Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dra. Vanessa G. Fraga

Dra. Luisa M. D. Magalhães

MSc. Camila Lopes

#### **National Institutes of Health, NIAD, NIH**

Dr. Patrick E. Duffy

Dra. Camila H. Coelho

Anne Berhe

#### **Centro de Pesquisa em Medicina Tropical**

Dr. Dhelio Batista Pereira

Marcella M. de Oliveira

#### **Tufts University**

Dr. Antonio Campos-Neto

Dra. Claudia Abejon

**Apoio financeiro:**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES – Bolsa de Doutorado (Código de Financiamento 001). Programa de internacionalização/CAPES PrINT – Bolsa de Doutorado Sanduíche (6 meses). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Grant# CBB APQ-00766-18). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grant# 421392/2018-5 e Grant# 302491/2017-1).

*Este trabalho é dedicado a todos aqueles que sofrem com a malária.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical por proporcionar minha formação e à equipe de coordenação do programa, em especial à Luciene Vieira e ao Prof. Dr. Eduardo Antonio F. Coelho, que sempre estiveram dispostos a ajudar com quaisquer necessidades, demandas e dúvidas.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, que foi de suma importância para o desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho. Em especial à CAPES, pela concessão das bolsas de doutorado e de doutorado sanduíche (PrINT), e às demais agências (CNPq e FAPEMIG).

À Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno, que me recebeu de braços abertos no laboratório e proporcionou todas as ferramentas (intelectuais e financeiras) para que eu pudesse me desenvolver profissional e pessoalmente. Muito obrigada pela confiança e apoio incansável durante toda essa trajetória.

Ao Dr. Patrick E. Duffy e à Dra. Camila H. Coelho por me receberem no National Institutes of Health durante o período sanduíche. Obrigada pela confiança e investimento na minha formação e no nosso projeto.

Aos colaboradores externos do trabalho, em especial ao Dr. Dhelio B. Pereira e a Marcela M. de Oliveira por terem fornecido toda a infraestrutura e suporte durante o período de coleta de amostras de campo em Porto Velho (RO, Brasil), e ao Dr. Antonio Campos-Neto pela parceria na concepção intelectual de parte deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos (LICP) que foram de suma importância no desenvolvimento deste trabalho; seja através de discussões científicas, auxílio nos experimentos de bancada ou pela convivência e trocas diárias. Em especial à Dra. Vanessa Gomes Fraga e Michele Matos, pela excelente gestão do laboratório e amizade; à Isabella Carvalho, que foi minha primeira aluna de iniciação científica. A Dra. Luisa Magalhães que teve papel essencial nas análises dos resultados. A Msc. Camila Lopes pela ajuda imprescindível nos trabalhos de campo em Porto Velho. Ao clã do “Lula é lindo e presidente” (você sabem quem são), os momentos com vocês trouxeram muito mais leveza para esta caminhada.

Aos professores que cruzaram meu caminho durante o período de doutoramento, sejam do programa de pós-graduação ou do curso de Biologia do Parasitismo (Woods Hole, MA, USA); obrigada por alimentarem a minha paixão pela medicina tropical.

Ao Presidente da República Federativa do Brasil, Luís Inácio Lula da Silva, por priorizar e reconhecer a ciência como um dos importantes pilares para o desenvolvimento da nação.

Aos meus amigos especiais que são companheiros na jornada da vida (você sabem quem são). Obrigada por trilharem esse caminho comigo, às vezes de forma paralela, outras em intercessão. Os momentos de alegria e aflições compartilhados me ajudaram e ajudam, todos os dias, a construir o ser humano que quero ser.

À família Fantin, que é minha base e meu ponto de referência. Tudo que eu sei sobre amar e ser amado vem de vocês.

À minha mãe Adriana e padrasto Edgard, por me receberem de braços abertos em Peruíbe nos períodos de férias e feriados. Poder estar aí teve um papel muito importante na manutenção da minha saúde mental durante o meu doutoramento.

À Marcella e Liz, que são meu ponto de equilíbrio e de conexão com a minha essência.

Ao meu pai, Persio, que merece menção honrosa porque sempre foi a pessoa que mais acreditou e torceu por mim, movendo mundos e fundos para que eu pudesse aproveitar todas as oportunidades que cruzaram o meu caminho. Seu incentivo incansável foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelo grande exemplo de profissional dedicado e de ser humano empático, sou sua fã.

À Iolanda, minha companheira de quatro patas que me fez feliz todos os dias.

*“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho”.*

(A hora da estrela – Clarice Lispector)

## RESUMO

O *Plasmodium vivax* representa um grande desafio no controle da malária devido a sua vasta distribuição ao redor do globo, grande frequência de infecções submicroscópicas e habilidade de induzir recaídas em consequência das formas evolutivas que podem ficar latentes no fígado por longos períodos (hipnozoítos). O recente aumento de cepas de *P. vivax* resistentes aos fármacos disponíveis, a evolução de formas mais virulentas do parasito e a produção precoce de gametócitos, característica desta espécie, contribuem para classificar a malária vivax como um problema de saúde pública que merece atenção. Ainda que reconhecido por suas características biológicas peculiares e pelo agravamento recente de sua virulência, poucos investimentos têm sido feitos no desenvolvimento de ferramentas de controle para vivax. Portanto, o presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar novos alvos potenciais utilizando amostras de diferentes áreas endêmicas ao redor do mundo (Brasil, Mali, Camboja e Estados Unidos da América). Para tanto, investigamos e caracterizamos uma proteína recém descoberta na urina de pacientes naturalmente infectados (*PvVir14*); e descrevemos o potencial imunogênico de epítomos de células B de uma das proteínas mais bem caracterizadas de *P. vivax*, a *PvAMA-1*. Anti-IgG circulantes contra *PvVir14* apareceram em 61% e 34.5% dos indivíduos do Brasil e Camboja, respectivamente, enquanto que indivíduos de Mali (infectados com *falciparum* e não expostos a vivax), tiveram 0% de reconhecimento. Ainda, os níveis de anti-*PvVir14* correlacionaram-se com aqueles contra outros antígenos de vivax já bem caracterizados, como a *PvCSP* e a *PvDBP*, que foram reconhecidos por 7.6% e 42% dos indivíduos respectivamente. Com relação ao perfil celular, indivíduos sororreativos para *PvVir14* apresentaram níveis significativamente maiores de células B atípicas circulantes (CD 21<sup>-</sup> CD 27<sup>-</sup>), sugerindo que tal tipo celular possa estar ligado à resposta anti-*PvVir14*. Entre as células T, os níveis de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> diferiram entre indivíduos com e sem anticorpos contra *PvVir14* (menor e maior expressão, respectivamente), enquanto que os níveis de células NKT foram mais expressivos em indivíduos sem anti-*PvVir14*. Se tratando da *PvAMA-1*, a antigenicidade dos peptídeos com epítomos para células B previamente selecionados foi avaliada através de múltiplos ensaios sorológicos utilizando amostras de indivíduos com infecção aguda por *P. vivax* do norte do Brasil. Os peptídeos sintéticos foram reconhecidos por 45.5%, 48.7% e 31.2% (PI, PII e PIII, respectivamente) dos

indivíduos selecionados para o estudo. Quando sintetizados em conjunto (tripeptídeo), a reatividade aumentou para 62%, porcentagem comparável àquela obtida pela proteína em sua forma e tamanho originais (57%). Além disso, a reatividade anti-IgG contra o tripeptídeo foi reduzida em 42% pós-depleção, indicando que tais epítopos podem ser responsáveis por parte considerável da imunogenicidade da proteína. Esses resultados representam uma excelente perspectiva na identificação de novos alvos com potencial imunogênico para compor uma vacina, ou auxiliar no desenvolvimento de outras medidas de controle, como testes diagnósticos, já que contemplar diversos alvos do ciclo de vida do parasito parece ser a chave para alcançar a resposta robusta e protetora que uma vacina contra a malária vivax precisa para ter sucesso.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium vivax*, Imunidade humoral, PvVir14, PvAMA-1

## ABSTRACT

*Plasmodium vivax* is a major challenge for malaria control due to its wide geographic distribution, high frequency of submicroscopic infections, and ability to induce relapses due to the latent forms present in the liver (hypnozoites). The recent increase in drug-resistant *P. vivax* strains, the evolution toward more virulent forms and the early production of gametocytes adds up to make *P. vivax* malaria a public health issue of increasing importance. Besides its tricky biological features and new awareness of its virulence, minimal investments have been made in vaccine discovery for *P. vivax*. Given that, this study aimed to discover and characterize potential new targets for future vaccine development using samples from different endemic areas around the world (Brazil, Mali, Cambodia and United States of America). For this purpose, we investigated and characterized a novel protein recently discovered in the urine of naturally infected subjects (*PvVir14*) and described the immunogenic potential of peptides from a well-known vivax protein (*PvAMA-1*), which has been proved to have important B cell epitopes that can induce specific immune response. Circulating antibodies against *PvVir14* appeared in 61% and 34.5% of subjects from Brazil and Cambodia, respectively, versus none (0%) of the *P. falciparum*-infected subjects from Mali who have no exposure to *P. vivax*. *PvVir14* antibody levels correlated with those against other well-characterized sporozoite/liver (*PvCSP*) and blood stage (*PvDBP-RII*) antigens, which were recognized by 7.6% and 42% of Brazilians, respectively. Concerning the cellular immune profiling of Brazilian subjects, *PvVir14* seroreactive individuals displayed significantly higher levels of circulating atypical ( $CD21^- CD27^-$ ) B cells, raising the possibility that atypical B cells may contribute to the *PvVir14* antibody response. Among T cells,  $CD4^+$  and  $CD8^+$  levels differed (lower and higher, respectively) between subjects with versus without antibodies to *PvVir14*, while NKT cell levels were higher in those without antibodies. As for *PvAMA-1*, the antigenicity of the selected B-cell peptides was assessed by multiple serological assays using sera from acute *P. vivax* infected subjects. The synthetic peptides were recognized by 45.5%, 48.7% and 32.2% of infected subjects for peptides I, II and III respectively. Moreover, when synthesized together (tripeptide), the reactivity increases up to 62%, which is comparable to the reactivity found against the whole protein *PvAMA-1* (57%). Furthermore, IgG reactivity against the tripeptide after depletion was reduced by 42%, indicating that these epitopes may be responsible for a considerable part of the protein

immunogenicity. These results represent an excellent perspective on discovering new targets with immunogenic potential to compose a vaccine, or even to assist the development of other control measures, such as diagnostic tools, since contemplating several targets seems to be the key to achieving a robust and protective response that a malaria vaccine needs to be successful.

Key-words: Malaria, *Plasmodium vivax*, Humoral Immunity, PvVir14, PvAMA-1

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 – Mapa de países endêmicos para a malária indicando redução e aumento de incidência desde 2015 de acordo com a Estratégia Global para Malária.....	29
Figura 2 – Distribuição espacial de casos clínicos de malária por <i>Plasmodium vivax</i> e <i>Plasmodium falciparum</i> no Brasil no ano de 2021.....	31
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrado humano e no hospedeiro invertebrado.....	36
Figura 4 – Diagrama esquemático da forma tridimensional (PDB:1W81) e dos domínios estruturais de PvAMA-1.....	48

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 – Candidatos a vacina contra <i>Plasmodium vivax</i> em fase de estudo clínico.....	26
Tabela 2 – Características epidemiológicas e demográficas dos indivíduos selecionados para o estudo.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ANOVA – Análise de Variância  
CEPEM – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical  
DARC – Duffy Antigen/Receptor for Chemokines  
DBP – Duffy Binding Protein  
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase  
Ig - Imunoglobulina  
IgG – Imunoglobulina G  
IgM – Imunoglobulina M  
IL - Interleucina  
INA – Imunidade Naturalmente Adquirida  
JM – Junção móvel  
LICP – Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos  
MA – Massachusetts  
mRNA – RNA mensageiro  
MSPs – Proteínas de Superfície de Merozoítos  
NIH – National Institutes of Health  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PBMC – Células Mononucleares de Sangue Periférico  
*PfCSP* – proteína circunsporozoíta de *Plasmodium falciparum*  
*PvAMA-1* – Antígeno de Membrana Apical 1 de *Plasmodium vivax*  
*PvCSP* – proteína circunsporozoíta de *Plasmodium vivax*  
PNCM – Programa Nacional de Controle da Malária na Região Amazônica  
*PvVir14* – Proteína VIR de *Plasmodium vivax*  
RBPs – Proteínas de Ligação a Reticulócitos  
RO – Rondônia  
RON – Proteína de pescoço de roptria  
TNF – Fator de Necrose Tumoral  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
USA – United States of America  
VBT – Vacina de Bloqueio de Transmissão

## SUMÁRIO

---

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	21
<b>2 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	28
3.1 A Malária no mundo e no Brasil.....	28
3.2 Ciclo biológico do parasito.....	33
3.3 A doença.....	37
3.3.1 Métodos diagnósticos.....	37
3.3.2 Tratamento.....	38
3.4 Resposta imune na malária vivax.....	39
3.4.1 Imunidade inata.....	39
3.4.2 Imunidade adaptativa.....	39
3.5 Estratégias para seleção de alvos antigênicos que possam vir a compor vacinas de subunidades.....	43
3.6 Principais antígenos candidatos a vacinas contra <i>P. vivax</i> .....	44
3.6.1 Antígenos de membrana apical (AMA-1).....	47
3.6.2 Famílias multigênicas de <i>Plasmodium</i> e a PvVir14.....	49
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	52
4.2 Objetivo geral.....	52
4.2.1 Objetivos específicos.....	52
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	54
5.1 Populações e área de estudo.....	54
5.2 Obtenção de plasma e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).....	55
5.3 PvAMA-1 – seleção de epítomos com potencial imunogênico.....	56
5.3.1 Síntese e espectrometria de massa de peptídeos solúveis.....	56
5.3.2 Espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	57
5.4 PvVir14 – peptídeo descoberto através de espectrometria de massa em urina de pacientes com infecção aguda por <i>P. vivax</i> .....	57
5.4.1 Análise das urinas por espectrometria de massa .....	58
5.5 Expressão das proteínas PvAMA-1 e PvVir14.....	58
5.6 Ensaio sorológicos para PvVir14, PvAMA-1, PI, PII, PIII e tripeptídeo.....	59
5.6.1 Detecção de anticorpos IgG e IgM por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	59

5.6.2 Detecção de subclasses de IgG por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	60
5.6.3 Elisa de depleção para PvAMA-1 e peptídeos sintéticos.....	60
5.7 Ensaios sorológicos para demais proteínas (Pvs230D1M, PvDBP-RII, PvCSP).....	61
5.8 Citometria de fluxo para caracterizar PBMCs de indivíduos infectados, tratados e expostos à <i>P. vivax</i> .....	61
5.9 Sequenciamento dos genes V (VDJ) de células B de memória específicas para <i>P. vivax</i> .....	62
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	64
6.1 New Highly antigenic linear B Cell epitope peptides from PvAMA-1 as potential vaccine candidates.....	65
6.2 Proteomic analysis of urine from patients with <i>Plasmodium vivax</i> malaria unravels a unique <i>P. vivax</i> protein that is absent from <i>P. falciparum</i> .....	80
6.3 Immunological characterization of a VIR protein family member (VIR-14) in <i>Plasmodium vivax</i> -infected subjects from different epidemiological regions in Africa and South America.....	88
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO</b> .....	112
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	114
<b>9 ANEXOS</b> .....	127

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

---

O trabalho intitulado “**Identificação, caracterização e determinação de padrões da resposta imune de epítomos imunogênicos de *Plasmodium vivax***” foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos (LICP), sob coordenação da Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno dentro da linha de pesquisa “Imunologia das doenças infecciosas e tropicais” do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A definição do tema do estudo se deu levando em consideração que a malária é uma doença negligenciada de grande importância e que no Brasil atinge, em especial, a região Norte de forma bastante expressiva. Ainda, a determinação de *Plasmodium vivax* como a principal espécie de interesse neste trabalho atende a uma demanda crescente de informação a respeito desta espécie, que é responsável por cerca de 90% dos casos registrados no país além de comprovadamente ser a mais difundida ao redor do globo. Ademais, nos últimos anos, *P. vivax* vem sendo descrita como capaz de causar infecções graves e até fatais, resultando em índices de morbidade e mortalidade globais bastante significativos. Desse modo, estudos que têm como objetivo ampliar o repertório do conhecimento acerca da biologia do parasito são essenciais para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle, tais como vacinas, fármacos e ferramentas diagnósticas. De forma complementar, o tema se alinha de forma bastante significativa com as linhas de pesquisa atualmente desenvolvidas no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos (LICP), que envolvem a descoberta de alvos imunogênicos através de metodologias de vacinologia reversa, predição de epítomos por meio de técnicas de bioinformática e, ainda, a avaliação de tais alvos utilizando diferentes imunoenaios.

O estudo foi realizado utilizando amostras biológicas (soro e células mononucleares de sangue periférico/PBMCs) de três diferentes regiões endêmicas para a malária: Brasil (região Norte), Camboja e Mali; além de amostras provenientes de doadores de regiões não endêmicas: Brasil (região Sudeste) e Estados Unidos da América. De relevância, as amostras do Brasil foram coletadas em Porto Velho (RO) durante o período de doutoramento em colaboração com o Centro de Pesquisa em

Medicina Tropical (CEPEM). Ainda, parte do trabalho foi realizado em colaboração com o National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) durante período de doutorado sanduíche. Além das importantes colaborações, durante os quatro anos de doutoramento, foram publicados três artigos científicos oriundos da tese, que são respectivamente intitulados: New highly antigenic linear B cell epitope peptides from *PvAMA-1* as potential vaccine candidates (PLoS One); Proteomic analysis of urine from patients with *Plasmodium vivax* malaria unravels a unique *Plasmodium vivax* protein that is absent from *Plasmodium falciparum* (Tropical Medicine and Infectious Disease); e Immunological characterization of a VIR protein Family member (VIR-14) in *Plasmodium vivax*-infected subjects from different epidemiological regions in Africa and South America (PLoS Neglected Tropical Diseases) (todos anexados na seção “Resultados e Discussão”). Parte da pesquisa também foi apresentada em diversos congressos científicos, sendo agraciada como uma menção honrosa no eixo temático de Protozoologia do XXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia (2021).

A redação deste documento foi realizada de acordo com a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013; que regulamenta o formato dos trabalhos finais e de qualificação, estabelecendo condições para a marcação das defesas de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.



## 2. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença de reconhecida importância que tem impactado populações ao redor do globo de forma consistente no último século. Embora atinja milhões de pessoas todos os anos, em especial nas regiões tropicais e subtropicais, a malária se enquadra na categoria denominada como “doenças negligenciadas”. Tal categoria reúne, principalmente, aquelas enfermidades que apresentam baixíssimo investimento financeiro em pesquisas científicas que visam o desenvolvimento de medidas de controle e medicamentos. O principal motivo para o desinteresse nas doenças abarcadas nesta categoria é o fato de que, via de regra, elas acometem populações de baixa renda de regiões em desenvolvimento. Dentre as espécies capazes de infectar o homem, duas predominam como responsáveis por infecções no Brasil e no mundo: *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*.

O desafio de reduzir o impacto dessa doença nas populações vulneráveis é ainda maior quando levamos em consideração a crescente resistência do parasito aos fármacos atualmente disponíveis (Ntumngia *et al.*, 2016), a evolução do parasito para formas mais virulentas (Riley and Stewart, 2013) e, ainda, se tratando especificamente de *P. vivax* – que é o foco deste trabalho – a produção precoce de gametócitos e a formação de hipnozoítos. Evidências recentes demonstram que a gravidade clínica da malária vivax pode estar sendo subestimada, com registros frequentes de incapacitação de indivíduos de todas as idades devido a episódios febris recorrentes e anemia grave (Kochar *et al.*, 2009; Alexandre *et al.*, 2010; Antinori *et al.*, 2012; Rahimi *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2016). À medida que esses relatos de gravidade clínica e casos letais se tornam mais frequentes, o desenvolvimento de uma vacina antimalárica eficaz para *P. vivax* se apresenta como um importante pilar a ser incluído nas medidas de controle, que atualmente consistem em: (i) diagnóstico e tratamento oportunos; (ii) busca ativa e eliminação de criadouros e; (iii) uso de repelentes e mosquiteiros impregnados no combate ao mosquito vetor (Wangdi *et al.*, 2018; Baia-Da-Silva *et al.*, 2019). Inúmeros desafios se interpõem na logística dessas medidas, dentre eles a inconstância e falta de interesse do poder público. Nesse sentido, a vacina funcionaria como uma estratégia independente e com um bom custo-benefício quando avaliado a longo prazo.

Na corrida para o desenvolvimento de vacinas, atualmente mais de 70 formulações estão em desenvolvimento para *P. falciparum*, com cerca de 20 em fase de estudo clínico (Agnandji *et al.*, 2012; Laurens *et al.*, 2017; Olotu *et al.*, 2018; Duffy and Patrick Gorres, 2020; Molina-Franky *et al.*, 2020). Ainda, recentemente a Organização Mundial da Saúde autorizou e recomendou o uso de uma delas, a RTS,S/AS0, que tem como população alvo crianças que vivem em regiões de transmissão moderada a alta (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015; Penny *et al.*, 2016; WHO, 2021). Infelizmente, os mesmos avanços não são observados para *P. vivax*, já que as poucas abordagens que evoluíram para estudos clínicos tiveram resultados insatisfatórios, muito por questões peculiares e particulares da espécie, que precisam ser desvendadas e contornadas. Atualmente, somente seis antígenos se encontram em fase inicial de estudo clínico para esta espécie (Tabela 1), reforçando a necessidade de investimento intelectual, prático e financeiro nesta espécie. Nesta perspectiva, a recente disponibilidade de sequências completas do genoma, proteoma e transcriptoma de *P. vivax* (Bozdech *et al.*, 2008; Carlton *et al.*, 2008; Moreno-Pérez *et al.*, 2015; Ray *et al.*, 2016) possibilitou a expansão do conhecimento a respeito da biologia do parasito, uma vez que funções de diversas proteínas puderam ser previstas e validadas; antígenos potenciais puderam ser rastreados de acordo com características específicas (como local de expressão); e, ainda, informações críticas sobre perfis de expressão de proteínas durante as fases do ciclo de vida do parasito puderam ser acessadas. Embora a publicação dessas sequências tenha tido um papel importante na descoberta de alvos, o panorama de vacinas contra *P. vivax* ainda precisa ser melhor explorado.

As características únicas de *P. vivax* representam o principal desafio na concepção de estratégias para construções vacinais (Adams e Mueller, 2017). Dois fatores importantes tornam a identificação de antígenos um grande desafio: (i) a complexidade do seu ciclo de vida, que apresenta inúmeros alvos potenciais; (ii) a enorme diversidade global entre as populações do parasito, que torna a indução de proteção transcendente um grande desafio. Portanto, uma vacina eficaz certamente precisará ser composta de vários alvos (Skwarczynski *et al.*, 2020). Nesse sentido, ferramentas de bioinformática como a vacinologia reversa e a predição de epítomos de células B em proteínas previamente identificadas apresentam-se como ferramentas essenciais na detecção de alvos potenciais.

Esta tese alia-se a diversas outras pesquisas básicas que visam ampliar o repertório de medidas de controle específicas para *P. vivax*. Para esta finalidade, experimentos utilizando amostras de populações de diferentes regiões endêmicas e não endêmicas, contemplando indivíduos infectados, expostos, não expostos e não infectados, foram realizados de modo a caracterizar a resposta imune naturalmente adquirida frente aos antígenos investigados.

Candidato	Fase	Achados principais	Registro
<b>Candidatos de fase pré-eritrocítica</b>			
VMP001	1/2a	Redução de parasitemia, mas baixa eficácia.	NCT01157897
Peptídeos N R&C	1b/2	Resposta humoral de longa duração, com 36% de eficácia em voluntários nunca infectados/expostos.	NCT0108184
PvRAS	1/2a	Baixa resposta celular, 42% de eficácia.	NCT01082341
<b>Candidatos de fase sanguínea</b>			
ChAd63-MVA-PvDBPII	1a/2a	Indução de anticorpos inibidores da interação com reticulócitos; respostas humoral e celular; 50% de resposta cepa-transcendente.	NCT01816113
PvDBPII-GLA-SE	1	Alta produção de anticorpos inibidores da interação com reticulócitos; resposta cepa-independente.	CTRI/2016/09/007289
<b>Candidatos de bloqueio de transmissão</b>			
Pvs25	1	Indução de anticorpos protetores; 30% de redução de mosquitos infectados	NCT00295581

**Tabela 1:** Candidatos a vacina contra *Plasmodium vivax* em fase de estudo clínico (Da Veiga *et al.*, 2023, Adaptado).

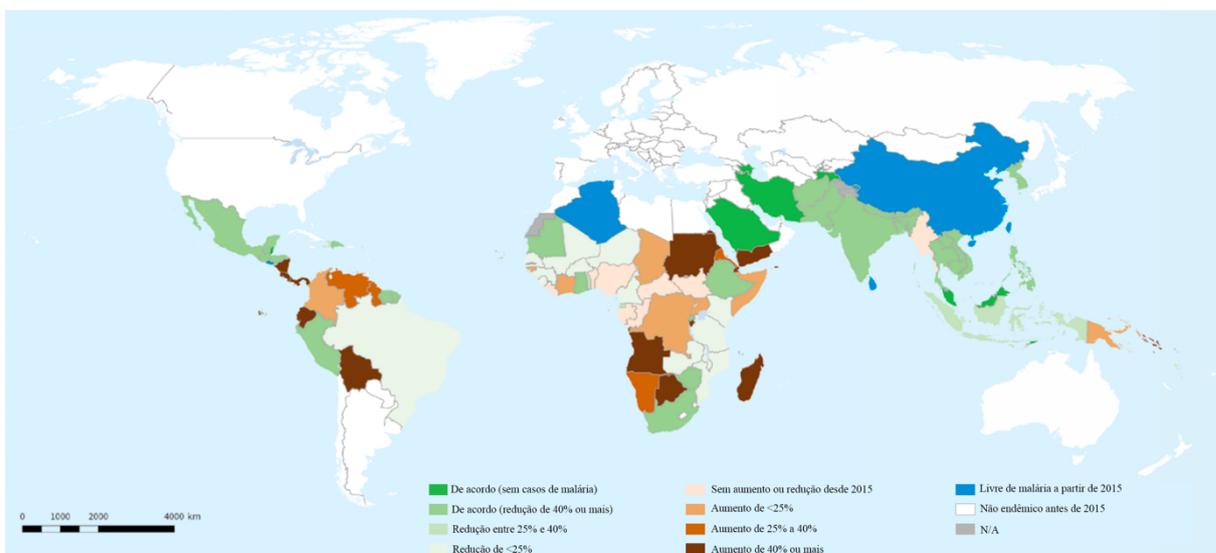


### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A malária no mundo e no Brasil

A malária tem sido uma doença de grande importância epidemiológica ao longo da história ao redor do mundo. Causada por protozoários do filo Apicomplexa e transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*, atualmente mais de 120 espécies são conhecidas por causarem a doença em diferentes hospedeiros vertebrados, incluindo répteis, aves e primatas (Talapko *et al.*, 2019; WHO, 2020). Dessas, 7 já foram identificadas como capazes de infectar o homem: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium cynomolgi* e, mais recentemente, *Plasmodium simium* (Brasil *et al.*, 2017). Enquanto as duas primeiras são consideradas as mais importantes do ponto de vista de saúde pública, uma vez que são responsáveis por mais de 90% dos casos registrados anualmente (WHO, 2022); a última, comumente relacionada a infecções em primatas não humanos, foi recentemente associada a surtos de malária humana em regiões de mata atlântica em caráter zoonótico (Brasil *et al.*, 2017; De Alvarenga *et al.*, 2018; De Lemos *et al.*, 2021). Cerca de metade da população mundial corre risco de contrair malária, que atualmente é considerada endêmica em 87 países tropicais e subtropicais, abrangendo toda a África Subsaariana, bem como grande parte do Sudeste Asiático, do Mediterrâneo Oriental, do Pacífico Ocidental e das Américas (Roser and Ritchie, 2019). Os primeiros 15 anos do milênio foram marcados por uma diminuição consistente da incidência de malária, com mudanças significativas em sua distribuição geográfica e uma redução de cerca de 60% em termos de mortalidade. No entanto, nos últimos 5 anos, o progresso rumo à meta de eliminação da doença parece ter estagnado em um desbalanço, com um conjunto de países progredindo como esperado enquanto outros registram um agravamento na incidência da doença (Figura 1) (Varo *et al.*, 2020). No ano de 2021, foram registrados cerca de 247 milhões de casos ao redor do mundo com 627 mil mortes associadas, sobretudo no continente africano (WHO, 2022). Se tratando do Brasil, neste mesmo período, foram registrados pouco menos de 140 mil casos da doença, com vasta maioria proveniente da região conhecida como Amazônia Legal, que contempla os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Ministério da Saúde do Brasil, 2021). Embora considerado expressivo, esse número representa uma redução de cerca de 4% quando comparado ao

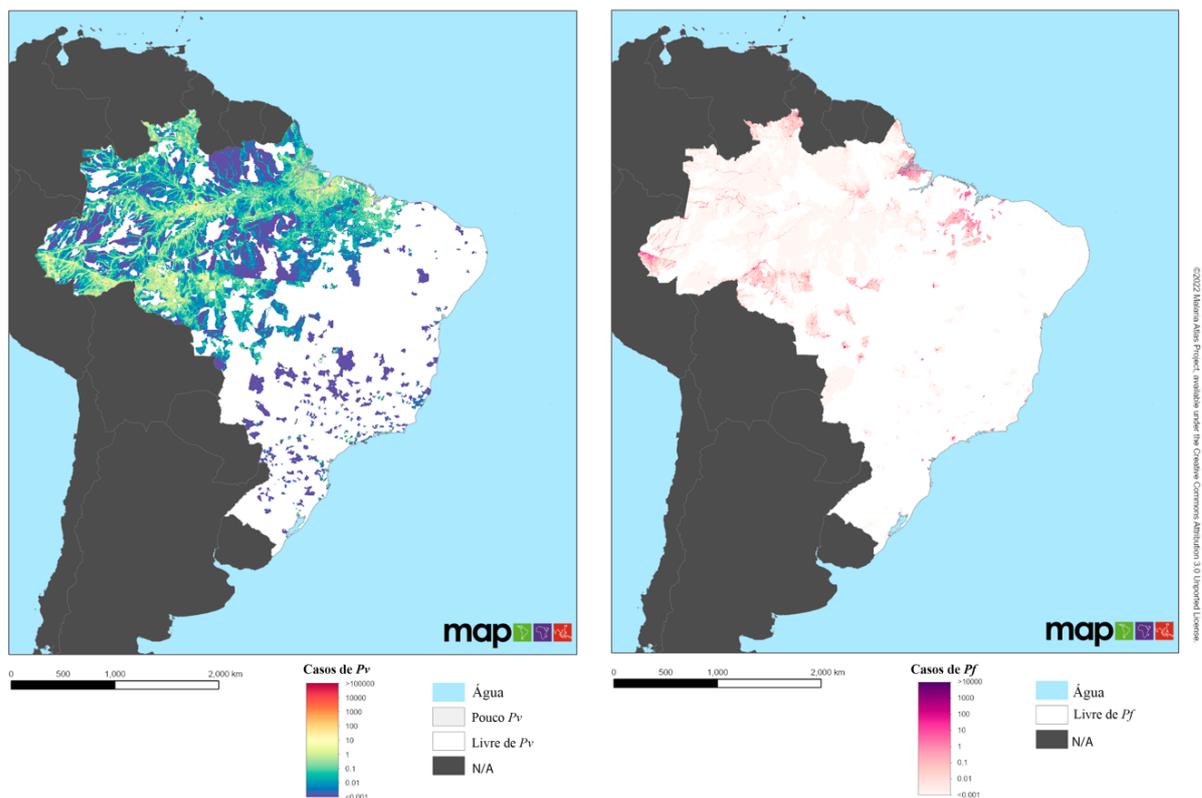
registrado no ano anterior (Secretaria de Vigilância Pública do Brasil, 2021). Assim como no mundo, os últimos anos foram marcados por flutuações no número de casos no país (por isso eventual redução pode não representar uma tendência de queda quando avaliada em série histórica), com picos de até cerca de 600 mil casos entre os anos de 1998 – 2000 e 2004 – 2006, porém as razões para tal variação ainda não são completamente compreendidas, embora acredita-se estarem ligadas a uma série de fatores como mudanças ambientais, má gestão da piscicultura, migração humana e recrudescência (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Ainda, a instabilidade dos números está intimamente ligada às medidas de contenção, que preconizam ações integradas de controle vetorial, diagnóstico oportuno e tratamento adequado (Adams e Mueller, 2017; Plewes *et al.*, 2019). Tais ações fazem parte do Programa Nacional de Controle da Malária na Região Amazônica (PNCM), que estabelece uma política permanente no combate dessa endemia (Ministério da Saúde do Brasil, 2003). Por se tratar de uma política pública que visa descentralizar as ações epidemiológicas e integrá-las às atividades da atenção básica, o financiamento e a valorização dessas medidas não acontece de forma homogênea, uma vez que os governos federal, estadual e municipal se alteram a cada ciclo eleitoral.



**Figura 1:** Mapa de países endêmicos para a malária indicando redução e aumento de incidência a partir de 2015 de acordo com a Estratégia Global para Malária (OMS, 2021, Adaptado).

Dentre as espécies que atualmente circulam no país – *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. simium* – destacam-se as duas primeiras: *P. vivax* por ser responsável

por ~90% dos casos registrados e *P. falciparum* (~9% dos casos) (Figura 2) (Recht *et al.*, 2017). Pelo fato de a transmissão de *P. vivax* ter mantido uma tendência ascendente a partir da década de 1990, enquanto a de *P. falciparum* sofreu reduções contínuas, o equilíbrio na proporção de casos entre as duas espécies diminuiu (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; Carlos *et al.*, 2019). De importância, as mortes relacionadas à malária no país seguiram o mesmo padrão de redução, já que são majoritariamente causadas por *P. falciparum* (Bezerra *et al.*, 2020). Porém, não raro observa-se um aumento temporário de casos de malária falciparum em determinadas localidades (Carlos *et al.*, 2019) e essa alta na dinâmica de transmissão normalmente se dá por extensas mudanças ambientais antropogênicas que favorecem o aumento da densidade vetorial, alterando o balanço das medidas de controle. Nesse sentido, o movimento migratório da população se apresenta como uma questão fundamental. Ainda que as movimentações transitórias associadas a viagens de negócios ou visitas sociais e de lazer possam contribuir para surtos em pequena escala em áreas originalmente livres de malária (De Pina-Costa *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2020), a migração contínua e de longo prazo com conseqüente desflorestamento e ocupação de áreas antes inabitadas têm papel significativo no registro de casos por essa espécie (Macdonald e Mordecai, 2019; Melo *et al.*, 2020).



**Figura 2:** Distribuição espacial de casos clínicos de malária por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* no Brasil no ano de 2021 (Malaria Atlas Project, 2023; Adaptado).

No que se refere à malária vivax, embora os casos por essa espécie tenham sido considerados, via de regra, como infecções benignas e por vezes assintomáticas (doença febril sem instabilidade hemodinâmica, hemólise ou anemia grave) por muito tempo (Villamil Gómez *et al.*, 2016), nos últimos anos casos graves têm sido registrados de forma cada vez mais frequente em diversas regiões endêmicas, inclusive no Brasil (Rahimi *et al.*, 2014). Dentre as possíveis manifestações clínicas e complicações, incluem-se: sangramento fatal por ruptura traumática ou espontânea de baço aumentado; convulsões; choque; hepatite; insuficiência renal; anemia grave e trombocitopenia; dificuldade respiratória; lesão pulmonar aguda; e insuficiência múltipla de órgãos. Ademais, a crescente evidência da presença de cepas de *P. vivax* resistentes aos fármacos, a evolução de formas mais virulentas do parasito, sua ampla distribuição geográfica, a produção precoce de gametócitos bem como a formação de hipnozoítos, são motivos de preocupação com relação a essa espécie (Ntumngia *et al.*, 2016). A presença de hipnozoítos no fígado, peculiar de *P. vivax*, pode levar a recidiva do parasito, que é uma forma de malária observada de maneira recorrente

em pessoas previamente tratadas (Melo *et al.*, 2020). Essa peculiaridade exige um esquema terapêutico diferenciado para casos por essa espécie, com a associação da cloroquina (atua eliminando formas sanguíneas) e da primaquina (atua eliminando hipnozoítos), de modo a alcançar a chamada cura radical (Brasil, 2010; Daher *et al.*, 2018). No entanto, o uso da primaquina pode enfrentar barreiras fisiológicas em indivíduos com deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que atua protegendo células vermelhas do estresse oxidativo (Cappellini e Fiorelli, 2008; Howes *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2017). Nesses pacientes, a primaquina pode induzir hemólise grave (Bowman *et al.*, 2005). No Brasil, a prevalência da deficiência nessa enzima varia e pode chegar a 10% em algumas regiões (Saad *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2012), e a frequência de hemólise entre esses pacientes é de 90% (Melo *et al.*, 2020). Ainda que testes rápidos pra identificar tal deficiência e garantir tratamento adequado de modo a reduzir o risco da hemólise já possam ser utilizados, sua adoção ainda é feita em pequena escala e de forma insuficiente (Kim *et al.*, 2011; Ley *et al.*, 2015; Ley *et al.*, 2019). De interesse, outra característica biológica peculiar a vivax é a baixa densidade parasitária, o que cria um desafio para o diagnóstico e tratamento oportuno de indivíduos infectados de modo a interromper a cadeia de transmissão (Price *et al.*, 2020).

Por esses motivos, esforços para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e vigilância epidemiológica, terapias e vacinas têm se acentuado no intuito de alcançar a meta de eliminação da doença em algumas regiões do globo. Dentre as medidas de controle possíveis, uma eventual vacina seria a ferramenta ideal para prevenir a malária ao redor do mundo. No entanto, seu desenvolvimento é tecnicamente bastante desafiador quando comparado ao de vacinas contra vírus e bactérias. Isso acontece, principalmente, porque o genoma do parasito da malária é muito mais complexo, além do fato de o *Plasmodium* possuir diferentes estágios em seu ciclo de vida e passar por fases de reprodução sexuada e assexuada em dois hospedeiros diferentes (vertebrado e invertebrado). Assoma-se a isso a falta de um mercado tradicional de vacinas para doenças que afetam desproporcionalmente países mais pobres e que, portanto, não despertam o interesse de grandes companhias farmacêuticas. Por esses motivos, a malária é considerada uma doença tropical negligenciada, especialmente no que se refere no incentivo ao desenvolvimento ferramentas que impeçam a reinfeção e/ou progressão da doença.

Especificamente se tratando de *P. vivax*, a organização e investimento para o desenvolvimento de iniciativas coerentes que preconizam a eliminação da espécie é substancialmente menor quando comparada a *P. falciparum*, contribuindo para um cenário ainda mais desfavorável. Tal dificuldade se baseia nas características peculiares da espécie já comentadas e, ainda, na inexistência de um sistema de cultura *in vitro* contínuo e da disponibilidade restrita de modelos animais adequados para auxiliar no estudo da biologia do parasito. De relevância, essa espécie infecta preferencialmente reticulócitos, que correspondem a apenas 1-2% do total de hemácias circulantes no sangue periférico, o que afeta o suporte a estudos conduzidos *ex vivo*. Os fatores citados anteriormente prejudicam o progresso de estudos mais aprofundados acerca da dinâmica e da biologia de *P. vivax*, que certamente poderiam resultar na identificação e avaliação da imunogenicidade de mais candidatos vacinais e alvos terapêuticos. Não obstante, a diversidade genética da espécie também se apresenta como um fator de importância, visto que a imunidade contra o parasito pode ser influenciada por epítomos imunodominantes e polimórficos, fazendo com que uma eventual resposta seja cepa-específica.

### **3.2 Ciclo biológico do parasito**

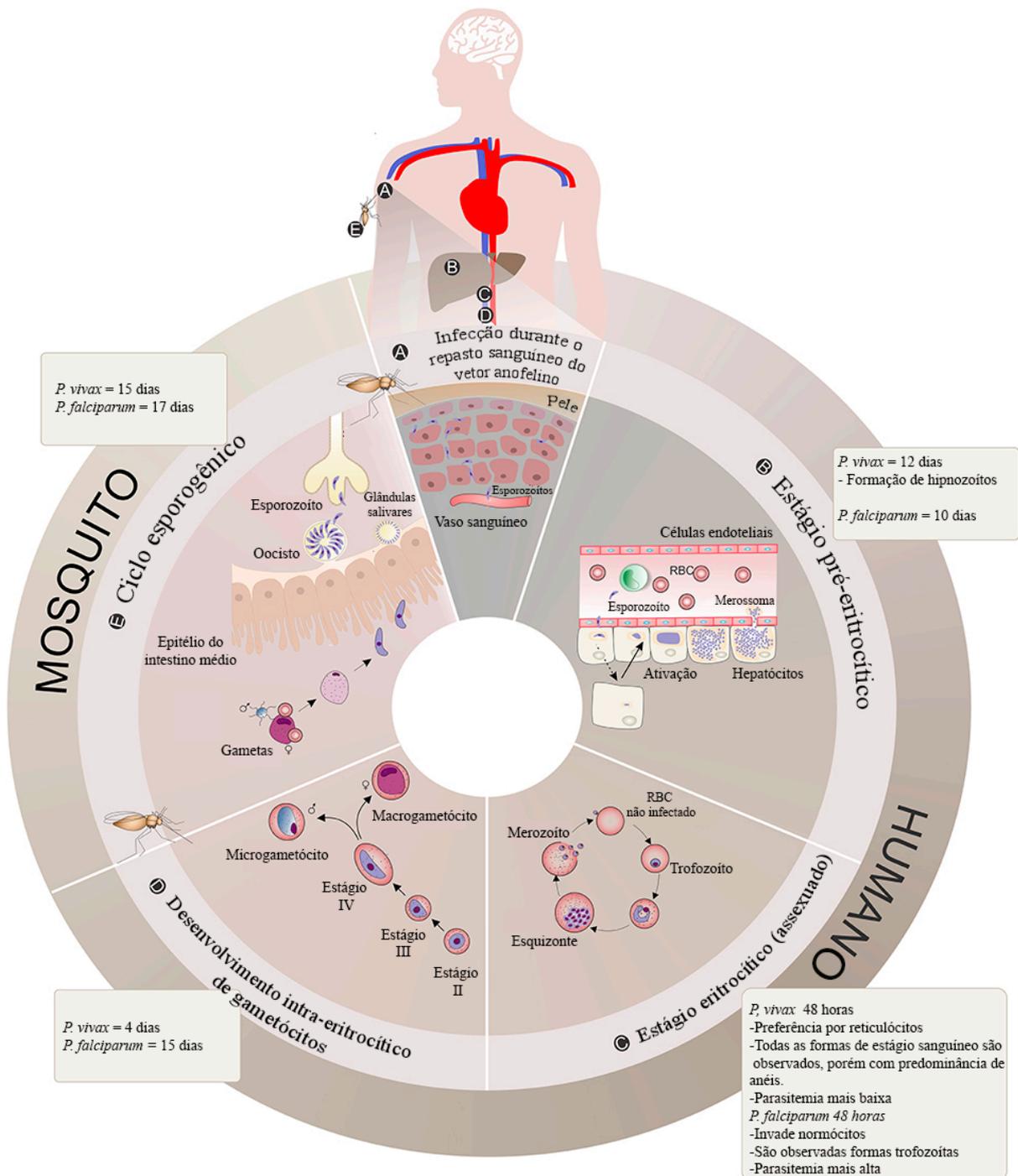
O ciclo biológico dos plasmódios inclui duas fases distintas de reprodução: uma sexuada que acontece dentro do hospedeiro invertebrado – fêmeas do gênero *Anopheles* – e outra assexuada, que se desenvolve no hospedeiro vertebrado (Figura 3). Durante o repasto sanguíneo do hospedeiro invertebrado, os esporozoítos – formas evolutivas alongadas com núcleo central e extremidades afiladas – são inoculados na pele do hospedeiro vertebrado (de 15 a 2000 formas) juntamente com vasodilatadores e anticoagulantes (Medica e Sinnis, 2005). Uma vez na pele, os esporozoítos atingem o sistema circulatório e migram para o fígado, com o objetivo de infectar hepatócitos. Uma rota alternativa através do sistema linfático já foi descrita por alguns autores, todavia, os parasitos não parecem chegar ao fígado através deste caminho, uma vez que ficam mais suscetíveis a serem capturados e fagocitados por células dendríticas e macrófagos (Amino *et al.*, 2006; Antonelli *et al.*, 2020). O processo de invasão dos hepatócitos é complexo e envolve inúmeras interações específicas. De interesse, sabe-se que os esporozoítos podem migrar extensivamente antes de se estabelecerem, no entanto, tal comportamento ainda não foi

completamente elucidado (Mota e Rodriguez, 2004). De relevância, para as espécies *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos podem permanecer em estado de latência no fígado e, eventualmente, levarem a episódios de recaída da doença. A essas formas especiais dá-se o nome de hipnozoítos (Krotoski, 1985). A infecção do fígado é uma fase essencial do ciclo de vida do *Plasmodium* e é clinicamente silenciosa, e há muito vem sido considerada como um bom alvo para o desenvolvimento de vacinas (Duffy e Gorres, 2020), já que bloquear o progresso do parasito nesta fase protegeria não somente contra a patologia da doença, mas como também a eventual transmissão a mosquitos vetores (Loubens *et al.*, 2021).

Já dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, por meio de sucessivas divisões por esquizogonia, dão origem aos esquizontes. Através do processo de brotamento de vesículas, os esquizontes maduros liberam merossomas, que ao atingirem a corrente sanguínea, liberam merozoítos (Sturm *et al.*, 2006). Uma vez na corrente sanguínea, esses merozoítos passam a invadir hemácias, dando início ao ciclo eritrocítico. A invasão das hemácias é um processo complexo, específico e altamente dependente de interações ligante-receptor, que se dá, principalmente, através da chamada Junção Móvel (JM), que consiste numa estrutura composta, em partes, por proteínas RON (proteína de pescoço de rospria) secretadas pelo parasito. A JM ancora o parasito na célula e serve como uma “peneira molecular”, que de forma seletiva exclui as proteínas do hospedeiro da membrana do vacúolo parasitóforo inicial, o protegendo da ação degradante dos lisossomos hospedeiros (Risco-Castillo *et al.*, 2015). Em *P. falciparum*, sabe-se que a proteína do parasito envolvida no processo de invasão é a antígeno de membrana apical (AMA-1), o que a torna peça-chave no sucesso da infecção. De interesse, estudos recentes demonstraram que a junção RON-AMA-1 também parece acontecer para *P. vivax* (Salgado-Mejias *et al.*, 2019). De forma importante, quando falamos de de *P. falciparum*, inúmeras vias de invasão já foram descritas (Petter e Duffy, 2015), no entanto para *P. vivax*, atualmente há apenas uma via bem caracterizada, que envolve a *Duffy Binding Protein* (DBP), proteína presente na região apical do merozoíto, e o receptor de quimiocinas de células humanas presente nos reticulócitos humanos (DARC – *Duffy Antigen/Receptor for Chemokines*). Ainda, foi descrito que *P. vivax* invade, preferencialmente, reticulócitos jovens imaturos, ou seja, aqueles que expressam o receptor CD71 +, também conhecido como Receptor de Transferrina 1

(Petter e Duffy, 2015; Antonelli *et al.*, 2020). Este tipo de glicoproteína media o transporte de ferro para as células através da ligação de transferrinas que servem como receptor para proteínas da família RBP (Proteínas de Ligação aos Reticulócitos) (Gruszczyk *et al.*, 2018). Junto ao complexo RON, elas formam a chamada “junção móvel irreversível”, que dá origem a um anel conectivo entre o merozoíto e os reticulócitos, e tal formação caracteriza uma invasão bem sucedida com subsequente replicação e aumento exponencial de merozoítos (Antonelli *et al.*, 2020). Após inúmeras gerações de merozoítos, alguns se diferenciam em gametócitos femininos e masculinos, formas sexuadas do parasito que amadurecem sem sofrer divisão celular. Quando ingeridas pela fêmea do *Anopheles* durante repasto sanguíneo, dá-se início ao ciclo sexuado do parasito dentro do vetor invertebrado.

No mosquito, os gametócitos masculinos e femininos se diferenciam em gametas que, dentro do intestino médio, se fundem para a formação do zigoto. Horas depois, o agora denominado oocineto se desloca através de células epiteliais por movimentos ameboides a fim de se fixar entre o epitélio e a membrana basal. Uma vez fixado, o oocineto passa a se chamar oocisto, momento quando se inicia o processo de multiplicação esporogônica. Em aproximadamente duas semanas, a parede do oocisto se rompe, liberando os esporozoítos que prontamente invadem a hemolinfa do mosquito. Através desta via, os esporozoítos migram até as glândulas salivares, completando o ciclo do *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado (Josling e Llinás, 2015; De Niz *et al.*, 2018).



**Figura 3:** Representação esquemática do ciclo do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado humano e no hospedeiro invertebrado – mosquito *Anopheles*. A) Infecção através do repasto sanguíneo da fêmea do mosquito anofelino com a inoculação de esporozoítos na pele do hospedeiro. B) Infecção em estágio pré-eritrocítico onde os esporozoítos migram através de células de Kupfer ou endoteliais para o fígado, invadem hepatócitos e passam pelo processo de esquizogonia com consequente liberação de merozoítos. C) Estágio eritrocítico assexuado com invasão de eritrócitos. D) Desenvolvimento intra-eritrocítico de gametócitos: determinado número de parasitos sofre gametocitogênese e geram gametócitos – forma infectante para o mosquito vetor. E) Estágio no mosquito vetor: Gametócitos circulantes podem ser

ingeridos durante o repasto sanguíneo e dar origem ao ciclo sexual no intestino médio do mosquito. (Adaptado de Bourgard *et al.*, 2018).

### 3.3A doença

De forma geral, a malária é uma doença curável se diagnosticada de maneira oportuna e tratada da forma correta e em tempo hábil. Suas manifestações são normalmente caracterizadas como (i) não complicada ou (ii) grave/complicada. Os sintomas clínicos clássicos associados à malária são causados por parasitos do estágio eritrocítico/sanguíneo que, ao se desenvolver, produzem substâncias residuais tais como o pigmento de hemozoína, que podem se acumular e eventualmente serem despejados na corrente sanguínea. Uma vez circulantes, tais toxinas podem estimular células do sistema imune a produzirem citocinas e outros fatores solúveis que agem causando as principais sintomatologias associadas à doença. Na malária não complicada, a combinação mais comum de sintomas envolve: febre, calafrios, dores de cabeça, náusea, vômito, dores no corpo e mal estar generalizado (CDC, 2022). Eritrócitos parasitados por algumas espécies (em especial *P. falciparum*) podem aderir ao endotélio vascular das paredes dos vasos sanguíneos, a esse processo damos o nome de sequestro. Quando tal sequestro acontece em vasos cerebrais, a sintomatologia associada dá origem ao que chamamos de malária cerebral, que é a manifestação mais grave da doença e pode causar convulsões e outras anomalias neurológicas. Além da malária cerebral, outros sintomas também podem caracterizar um caso grave da doença. São eles: anemia grave devido a hemólise, hemoglobinúria, síndrome do desconforto respiratório, anormalidades na coagulação do sangue, falência de órgãos, lesão renal aguda e baixa pressão arterial. Estudos recentes demonstraram que *P. vivax* também tem a habilidade de promover cito aderência no endotélio do hospedeiro levando à formação de rosetas, característica até então associada somente à malária grave por *falciparum* (Ockenhouse *et al.*, 1991; Rowe *et al.*, 2009; Da Veiga *et al.*, 2022).

#### 3.3.1 Métodos Diagnósticos

O diagnóstico da malária deve ser feito de maneira oportuna de modo a garantir que o indivíduo tenha acesso ao tratamento, evitando que a doença evolua para formas mais graves. Além do diagnóstico clínico realizado através de anamnese e da avaliação dos sintomas, é necessário um teste laboratorial que comprove a presença

do parasito. Atualmente, o teste considerado padrão ouro para a malária se baseia na busca ativa de formas evolutivas do parasito através do método de gota espessa. Esta metodologia é muito eficiente, mas exige profissionais treinados e experientes para garantir sua qualidade. Além dela, outras metodologias também podem ser utilizadas para auxiliar no diagnóstico. São elas (i) Detecção de antígenos do parasito através de testes diagnósticos rápidos (TDRs); (ii) Técnicas moleculares de pesquisa de material genético do parasito. Essa modalidade também pode ser utilizada como controle de qualidade da microscopia, porém o custo elevado restringe seu uso (Ministério da Saúde do Brasil, 2021).

### 3.3.2 Tratamento

O tratamento da malária depende de inúmeros fatores, incluindo a gravidade da doença, a espécie do parasito e o local do mundo onde a infecção foi adquirida. Os dois últimos critérios ajudam a determinar a probabilidade de resistência do parasito a certos antimaláricos. Fatores adicionais como peso e gravidez podem limitar ainda mais as opções disponíveis. O tratamento tem como objetivos principais a (i) interrupção da esquizogonia sanguínea (responsável pela sintomatologia clínica da doença); (ii) eliminação de formas latentes da doença nas espécies que apresentam este estágio (*P. vivax* e *P. ovale*); (iii) eliminar as formas evolutivas que transmitem a doença para o mosquito anofelino (gametócitos) (CDC, 2023). Dessa forma, o esquema terapêutico utilizado no Brasil atualmente consiste na combinação da primaquina e da cloroquina para infecções por *P. vivax* e *P. ovale*. Esse arranjo aumenta as chances da chamada cura radical, que consiste na eliminação das formas sanguíneas e hepáticas, evitando recrudescências e recaídas. Caso haja falha no tratamento, um novo esquema utilizando artemeter/lumefantrina deve ser instituído; já para o *P. falciparum*, a OMS recomenda uma terapia combinada com derivados de artemisinina (ACT); e para *P. malariae*, outra espécie também presente no Brasil, o tratamento é feito somente com cloroquina. Indivíduos com características e circunstâncias específicas precisam de atenção na definição do protocolo terapêutico. Gestantes, crianças com menos de 6 meses de idade e pacientes com deficiência de G6PD não podem fazer uso de primaquina, portanto precisam ter o tratamento ajustado (Ministério da Saúde do Brasil, 2021).

### 3.4 Resposta imune na malária vivax

#### 3.4.1 Imunidade Inata

A infecção malárica envolve uma ativação deletéria de células imunes inatas (como por exemplo células dendríticas apresentadoras de antígenos) através de fragmentos derivados de *Plasmodium*, conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e os Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs), que são componentes endógenos liberados por células hospedeiras que se encontram em estresse, danificadas ou mortas (López *et al.*, 2017). O reconhecimento desses padrões leva ao amadurecimento dessas células dendríticas através de sinais intracelulares, que mediam a ativação de linfócitos T e B, células do tipo Natural Killer (NK) e macrófagos (Wykes e Good, 2008). Com frequência, há uma hiper ativação de células imunes inatas, o que leva a inflamação sistêmica responsável pelos sinais e sintomas iniciais da malária e que são mediadoras das formas graves da doença (Gazzinelli *et al.*, 2014; Antonelli *et al.*, 2020). Os PAMPs e DAMPs, que são personagens centrais nessa ativação robusta do sistema inato, são as estruturas reconhecidas pelos receptores imunológicos que são responsáveis por desencadear processos inflamatórios após infecção com determinado patógeno (Martinon *et al.*, 2009; O'Neill *et al.*, 2013). A ausência de um sistema de um cultivo para vivax, no entanto, dificulta a identificação de estruturas como essas que sejam específicas para a espécie, embora normalmente elas sejam conservadas dentro de um mesmo gênero. Diversos estudos já relaram a presença de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL) IL-6, TNF $\alpha$  e IL-8 no plasma ou soro de pacientes sintomáticos de *P. vivax* (Seoh *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008; Antonelli *et al.*, 2020). Citocinas circulantes voltam ao normal quando analisadas de 30-40 dias pós-tratamento e da chamada cura parasitológica. Em indivíduos assintomáticos, não se observa aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes e a consequente inflamação. Supõe-se que indivíduos assintomáticos sejam imunotolerantes e que, portanto, não apresentam os sinais de resposta inflamatória sistêmica visto em infecções por *P. vivax*.

#### 3.4.2 Imunidade Adaptativa

O desenvolvimento de uma imunidade clínica robusta e persistente observado em residentes de longa data de áreas endêmicas para malária indica que o

desenvolvimento de uma vacina eficaz é possível. Anticorpos foram identificados como um componente chave no combate à infecção e são considerados os principais provedores da chamada Imunidade Naturalmente Adquirida (INA). Tal conceito é baseado em um importante estudo conduzido em 1961 que demonstrou que a transferência de soro de adultos com histórico de casos de malária para crianças não infectadas poderia protegê-las da doença clínica (Cohen *et al.*, 1961). Diversos outros estudos elucidaram esse efeito de forma bastante clara: um inquérito epidemiológico conduzido em Vanuatu demonstrou que enquanto a morbidade resultante de infecções por *P. vivax* atingia seu pico em crianças entre 0 – 2 anos, pouca ou quase nenhuma era observada em indivíduos de 6 anos ou mais (Mueller *et al.*, 2013; Longley *et al.*, 2017). Já no oeste da Tailândia, tal pico foi observado entre 0 – 4 anos, diminuindo para um platô após os 25 anos de idade, confirmando que crianças são mais suscetíveis à doença clínica quando comparadas à adultos, e que esse efeito poderia ter a ver com exposições prévias ao parasito. Dessa forma, associações entre imunidade e o número de infecções são comumente observadas e demonstram que a morbidade causada pela malária diminui consideravelmente após sucessivas infecções. Em indivíduos residentes de áreas endêmicas, a imunidade adquirida via exposição garante que episódios clínicos da doença sejam cada vez menos frequentes (Barua *et al.*, 2019; Gonzales *et al.*, 2020). Esses indivíduos, denominados semi-ímmunes, ainda podem desenvolver parasitemia no estágio sanguíneo, porém a densidade parasitária é mais baixa e por vezes insuficiente para causar sintomas febris. De interesse, a velocidade na aquisição desse tipo de imunidade depende da intensidade de transmissão e espécie do parasito. Quando comparada com *falciparum*, *vivax* apresenta um desenvolvimento de resposta mais acelerado (Mueller *et al.*, 2013). A diferença na velocidade de aquisição de INA sugere que a imunidade funcional contra as duas espécies diverge de forma acentuada e isso muito provavelmente se deve às distintas características biológicas de *P. vivax*, como a presença de hipnozoítos, a dependência de poucas vias de invasão e a força da interação genética gerada a partir dessas peculiaridades (clones provenientes de recidivas podem servir como um reforço para o sistema imune ou se apresentar como uma ampliação ao repertório caso sejam geneticamente diferentes).

A ativação de células imunes e respostas inflamatórias são de extrema importância no processo de desenvolvimento da imunidade adquirida, especialmente no que se refere ao processo de geração de anticorpos, que têm papel importante no

controle da replicação dos parasitos (Stevenson and Riley, 2004; Gazzinelli *et al.*, 2014). Acredita-se que tal imunidade seja mediada por anticorpos específicos para o estágio sanguíneo, uma vez que experimentos com infecção controlada demonstraram que as principais mudanças transcricionais não ocorrem em células hematopoiéticas antes dos parasitos entrarem na fase sanguínea do ciclo (Rojas-Peña *et al.*, 2015). As funções efetoras mediadas por anticorpos podem incluir diferentes mecanismos, tais como inibição indireta (neutralização), bloqueio de interações da ligação parasito-hospedeiro, opsonização e ainda interação com receptores expressos nos fagócitos promovendo absorção e degradação celular (Beeson *et al.*, 2008). De importância, as propriedades funcionais dos anticorpos são influenciadas por múltiplos fatores, incluindo isotipo/subclasse, especificidade do epítomos, afinidade e glicosilação (Irani *et al.*, 2015). Dentre as classes de anticorpos, destacam-se a imunoglobulina G (IgG) e M (IgM). A maioria esmagadora dos estudos a respeito de anticorpos humanos com atividade protetora tem como alvo a imunoglobulina G e, como consequência, pouco se sabe sobre a dinâmica de aquisição e manutenção de IgM na malária ou de como esse anticorpo atua na mediação desses efeitos protetores (Boyle *et al.*, 2019). Várias classes de anticorpos são produzidas pelo hospedeiro quando infectado com malária, e embora a atividade protetora seja principalmente associada com IgG, diversos estudos já implicaram IgM em papéis de relevância no curso da infecção. O estudo pioneiro conduzido por Brown e colaboradores é particularmente interessante porque demonstrou que anticorpos IgM de crianças infectadas foram capazes de inibir o crescimento de *P. falciparum* *in vitro* (Brown *et al.*, 1986). Ainda, anti-IgM específicos podem atuar atenuando a severidade da doença ao inibir o fator de necrose tumoral (TNF) proveniente das toxinas liberadas durante a ruptura de eritrócitos (Pleass *et al.*, 2016). De forma geral, acredita-se que IgM é induzida nos estágios iniciais do curso da infecção com rápido decaimento e posterior “substituição” por IgG na fase de desenvolvimento de memória imunológica. Tal paradigma de indução precoce de IgM com posterior conversão para IgG foi observado na resposta imunológica de humanos contra múltiplos patógenos como dengue (Guzman *et al.*, 2010), vírus do Nilo Ocidental (Busch *et al.*, 2008) e HIV (Tomaras *et al.*, 2008). No entanto essa dinâmica não se confirmou para *Plasmodium*, cujo estudos demonstraram altos níveis de anticorpos IgM em indivíduos de áreas endêmicas com alta incidência de malária (Dodo *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2010; Adu *et al.*, 2016). Além disso, a existência de células B de memória expressando IgM

foi recentemente comprovada em amostras de indivíduos naturalmente expostos, o que sugere que talvez esse anticorpo tenha papel importante não apenas nas infecções primárias, mas também nas subsequentes (Krishnamurty *et al.*, 2016). Infelizmente não temos estudos e dados suficientes para vivax nesse sentido, e muito do que se sabe da resposta imune da espécie é baseado em *insights* das pesquisas com falciparum, outras *Plasmodium ssp.* em modelos experimentais ou, ainda, na resposta observada nos ensaios com candidatos em potencial. Embora seja razoável supor que os princípios se assemelhem, as diferenças significativas entre as espécies justificam cautela.

Se tratando dos anticorpos IgG – que são atores importantes e velhos conhecidos por desempenharem um papel importante na imunidade de *P. falciparum*, especialmente durante o ciclo sanguíneo – temos um cenário similar no que se refere a compreensão de seu papel de forma funcional (Beeson *et al.*, 2008; Tham *et al.*, 2017). Anticorpos para antígenos específicos, como por exemplo as proteínas PvDBP e PvAMA-1, se demonstraram capazes de inibir o crescimento do parasito, embora os estudos sejam bastante limitados por causa das dificuldades associadas à cultura *in vitro* dessa espécie. No entanto, ensaios que medem a capacidade de anticorpos de inibirem a ligação entre os parasitos e os receptores nas células hospedeiras, que têm a vantagem de não precisarem do cultivo do parasito, têm fornecido dados importantes sobre a capacidade funcional desses anticorpos (Vanbuskirk *et al.*, 2004; Grimberg *et al.*, 2007). De interesse, anticorpos IgG contra parasitos da fase sanguínea são majoritariamente pertencentes às subclasses citofílicas IgG 1 e IgG 3, que têm maior capacidade de mediar funções dependentes de receptores Fc e já foram associadas a proteção em estudos de INA (Cutts *et al.*, 2014).

A nível celular, INA em *Plasmodium vivax* também segue sendo muito pouco compreendida, porém é claramente um instrumento para uma resposta funcional e eficaz. Indivíduos que deixam áreas endêmicas rapidamente perdem suas células B e T específicas, confirmando que a exposição contínua é necessária, não somente para a indução das células efectoras e de memória, mas também para sua manutenção. Respostas pró-inflamatórias costumam ser robustas durante a fase aguda da malária vivax e promovem forte ativação de células imunes inatas, bem como linfócitos T CD4+, TCD8+ e B (Antonelli *et al.*, 2020). De interesse, embora a indução de células T CD4+ seja crítica no processo de produção de anticorpos pelas células B, existem evidências de que elas também tenham papel de destaque na

resposta imunorregulatória. No entanto, tais mecanismos, que são ativados nos estágios iniciais da infecção, podem limitar a capacidade do sistema imune de controlar a carga parasitária. Assim, compreender o balanço dessas respostas mediante infecção se faz necessário para um melhor entendimento de como se dá o desenvolvimento da imunidade e suas falhas, que fazem com que indivíduos que já foram expostos voltem a se infectar de forma recorrente.

### **3.5 Estratégias para seleção alvos antigênicos que possam vir a compor vacinas de subunidades**

A enorme complexidade de alguns microrganismos e a maneira como eles interagem com as células hospedeiras, em conjunto com a resposta imune promovida por eles, demanda uma busca por uma metodologia lógica e racional no desenvolvimento de vacinas que inclua a utilização de múltiplas proteínas (ou seus fragmentos) que estejam envolvidos nos processos de invasão de células suscetíveis. Uma síntese química contemplando diversos alvos permitiria a entrega de vários peptídeos que sejam funcionalmente relevantes e capazes de atingir diversas frentes no intuito de gerar uma resposta robusta (Patarroyo *et al.*, 2008). Especificamente se tratando da malária, detalhes sobre as vias de invasão utilizadas por *P. vivax* permanecem um enigma, já que ainda não se sabe ao certo quantas moléculas estão envolvidas no processo ou quais são os receptores presentes na maioria das proteínas já caracterizadas. O complexo e multifásico ciclo de vida apresenta desafios únicos, já que a imunidade contra o parasito tem tendência a ser espécie e cepa-específica. Com base nisso, uma vacina de antígeno único que contemple apenas um estágio do ciclo de vida provavelmente não será suficiente (Herrera *et al.*, 2004). Nesse contexto, a abordagem baseada em peptídeos sintéticos abrangendo diversos epítomos oriundos de uma ou mais fases (vacina multigênicas) é uma alternativa atraente para o desenvolvimento de vacinas contra a malária. Assim, critérios específicos podem ser adotados de modo a selecionar antígenos candidatos de forma mais eficiente; estes incluem (i) potencial antigênico; (ii) baixo polimorfismo e (iii) presença de epítomos de células B. Esse tipo de formulação normalmente incorpora epítomos do menor tamanho possível que sejam capazes de gerar uma resposta imune satisfatória. De forma importante, vacinas baseadas em peptídeos já foram descritas como capazes de

desencadear respostas protetoras maiores ou de eficiência similar do que abordagens que utilizam proteínas inteiras (Pearson *et al.*, 2010; Rosalia *et al.*, 2013). Além disso, são formulações extremamente estáveis, podem ser facilmente produzidas em grande escala, com alto rendimento e custo relativamente baixo (Satterthwait *et al.*, 1990; Patarroyo *et al.*, 2008).

A primeira vacina contra malária fundamentada nesse tipo de estratégia foi testada clinicamente em 1987 e teve sua racional baseada na repetição de sequências peptídicas derivadas da proteína circunsporozoíta CSP de falciparum (Herrington *et al.*, 1987). Desde então, uma variedade de vacinas peptídicas sintéticas foi desenvolvida para parasitas murinos (*P. berghei* e *P. yoelii*) e humanos (*P. falciparum* e *P. vivax*) e testadas quanto à imunogenicidade e eficácia, com algumas delas alcançando a fase de ensaios clínicos (Gerberding, 2013). A partir desses estudos, um banco de dados de mais de 500 mil epítomos de células B e T de proteínas de *Plasmodium* foi desenvolvido e este, atualmente, funciona como um repositório abrangente de potenciais alvos para serem estudados (Skwarczynski *et al.*, 2020).

### **3.6 Principais antígenos candidatos à vacina contra *P. vivax***

Atualmente, mais de 5.000 proteínas já foram identificadas dentro de *P. vivax* (Aurrecoechea *et al.*, 2009), e embora várias delas já tenham sido selecionadas como candidatos vacinais, ainda não se sabe ao certo quais são responsáveis pela imunidade clínica observada em áreas endêmicas. Nas últimas décadas, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de vacinas contra diferentes estágios evolutivos de *P. vivax*. Assim, uma vacina bloqueadora da transmissão – isto é, aquela cujo alvo são estágios do parasito que evoluem no mosquito vetor – poderia garantir a interrupção da transmissão e evitaria a reintrodução da doença em áreas onde a eliminação já foi alcançada (Mueller *et al.*, 2015). Por outro lado, uma vacina contra a fase pré-eritrocítica não só poderia prevenir a infecção sanguínea, mas também evitaria o estabelecimento de hipnozoítos, reduzindo assim o número de recaídas, conhecidas por contribuir para a manutenção da transmissão da doença. Por último, uma vacina contra os estágios sanguíneos, responsáveis pela doença clínica, reduziria consideravelmente a parasitemia e a gametocitomia associada, interferindo também no potencial de transmissão. De forma específica, se tratando dos candidatos de fase sexual, as chamadas vacinas de bloqueio de transmissão (VBT) se baseiam

em estratégias para prevenir o desenvolvimento do parasito no mosquito vetor. Os alvos mais estudados contemplam diversas fases do estágio sexual do parasito nos mosquitos, podendo atuar no bloqueio dos seguintes processos: fertilização (Pvs230, P48/45); invasão da glândula salivar (Saglin); e formação do oocisto (CelTos, APN1, Pvs25, Pvs28, WARP, CTRP, SOAP) (López *et al.*, 2017). Dois deles (*Pvs25* e *Pvs28*), os chamados antígenos pós-fertilização, são considerados como mais promissores porque interferem, em conjunto, na maturação do oocineto e na formação de oocistos (Wu *et al.*, 2015). De importância, experimentos conduzidos em modelos experimentais demonstraram que antissoros contra essas duas proteínas foram, de fato, capazes de reconhecer e suprimir de forma significativa o desenvolvimento de oocistos em diferentes espécies de *Anopheles*. Contudo, embora os resultados sejam animadores, uma futura VBT enfrentaria desafios na manutenção da resposta de anticorpos contra o parasito, já que não haveria o que chamamos de reforço natural mediante exposição (o hospedeiro humano não é exposto aos antígenos presentes no hospedeiro invertebrado) e a necessidade de constantes doses de reforço poderia comprometer a efetividade da vacina a longo prazo.

Já os candidatos de fase pré-eritrocítica contemplam desde os estágios iniciais da infecção por esporozoítos até a conclusão da fase hepática e avanço para o ciclo sanguíneo. Este é um gargalo importante do ciclo de vida dos plasmódios uma vez que neste momento da infecção, a carga parasitária ainda se encontra baixa. A origem de vacinas contemplando essa fase do ciclo se deu a partir de uma experiência utilizando esporozoítos irradiados, o que garantiu aos indivíduos cobaias uma proteção estéril (Nussenzweig *et al.*, 1967). De forma importante, estudos recentes confirmaram o potencial desse tipo de formulação vacinal, seja através da picada de mosquitos infectados ou injeção intramuscular. No entanto, desafios logísticos limitam esse tipo de abordagem e alternativas voltadas para vacinas de subunidades são atualmente tidas como mais promissoras. Dentre elas, a *PvCSP* – a proteína de superfície dos esporozoítos considerada como mais relevante – é o principal alvo já que é diretamente exposta ao sistema imune do hospedeiro durante a fase de migração que acontece no fígado. Na INA observada a partir do contato natural com *P. vivax* e em infecções humanas controladas, anticorpos anti-*PvCSP* foram correlacionados com proteção a curto prazo. Porém, este candidato desperta fatores de preocupação no que se refere à sua diversidade genética (bastante ampla) e

consequente comprometimento da especificidade da resposta. Até o momento, poucos estudos clínicos e pré-clínicos em humanos foram relatados. As formulações avaliadas até agora incluem peptídeos sintéticos, diferentes tipos de proteínas recombinantes, além de proteínas quimeras. Embora essas vacinas tenham se demonstrado seguras, elas são pouco imunogênicas e não conferiram proteção mediante ao desafio com esporozoítos. De modo a contornar essas questões, otimizações precisam ser realizadas considerando a adição de mais antígenos/peptídeos ou formulações adjuvantes que de modo a dar um *boost* na eficácia.

A patologia das infecções por *P. vivax* depende criticamente da capacidade do parasito de reconhecer e invadir reticulócitos. Este é um processo complexo que depende de uma série de interações ligante-receptor altamente específicas entre os merozoítos e as proteínas da superfície dos eritrócitos (Duffy e Patrick Gorres, 2020). As vacinas que têm como alvo antígenos dessa fase geralmente se concentram na indução de anticorpos neutralizantes capazes de bloquear as interações dos ligantes do parasito com as células do hospedeiro de modo a evitar a invasão, o crescimento e, por fim, a doença clínica (Salinas *et al.*, 2019). Ademais, uma vacina que contemple esse estágio tem o potencial de reduzir a gametocitemia no hospedeiro e, indiretamente, reduzir a transmissão. A resposta imune humoral a antígenos do ciclo sanguíneo é julgada como de extrema importância na INA para malária. Estudos pré-clínicos já caracterizaram antígenos de merozoíto como possíveis candidatos vacinais baseado na imunogenicidade gerada por eles em modelos experimentais, reconhecimento por anticorpos gerados por INA e, importante, pela capacidade de gerar anticorpos inibidores de ligação/invasão (Tham *et al.*, 2017). Dentre os principais candidatos dessa fase, incluem-se a *Duffy Binding Protein* (DBP), proteínas de ligação a reticulócitos (RBPs), proteínas de superfície de merozoítos (MSPs), que incluem as famílias MSP-1, MSP-3 e MSP-9, além do Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA-1) e das proteínas pertencentes a famílias multigênicas como a *PvVir14*, recém descoberta sendo excretada na urina de pacientes naturalmente infectados da Amazônia brasileira.

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

O Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA-1) é uma proteína transmembrana do tipo 1 de 83 kDa composta por um ectodomínio rico em cisteína que se divide em três domínios distintos (DI, DII, DIII), um domínio transmembranar (TR) e um domínio C-terminal (Figura 4) (Nair *et al.*, 2002). Esse antígeno, que já foi descrito como sendo expresso em esporozoítos e no estágio final da esquizogonia, se acumulando nos micronemas e superfície apical de merozoítos maduros, tem papel crucial no complexo sistema de junção móvel que media a internalização do parasito na célula hospedeira (Remarque *et al.*, 2008; Bargieri *et al.*, 2013). Embora AMA-1 também possa ser expressada no momento que precede a invasão de hepatócitos humanos, seu papel nessa fase não parece ser crucial como na fase sanguínea (Silvie *et al.*, 2004). Inicialmente identificada como um antígeno de superfície de *P. knowlesi* (Deans *et al.*, 1982), hoje acredita-se que esta proteína, que está presente em todas as espécies de *Plasmodium*, seja exclusiva dos apicomplexas e derivada de um único gene. Na malária, a invasão dos eritrócitos pode ser definida através de 4 etapas principais: (i) contato inicial do merozoítos com a célula hospedeira; (ii) reorientação do merozoítos de modo a garantir contato com a membrana celular; (iii) formação da JM através de ligações de alta afinidade; e (iv) formação do vacúolo parasitóforo e posterior multiplicação (Weiss *et al.*, 2015). De forma importante, AMA-1 já foi demonstrada como peça-chave em dois desses processos (ii e iii).

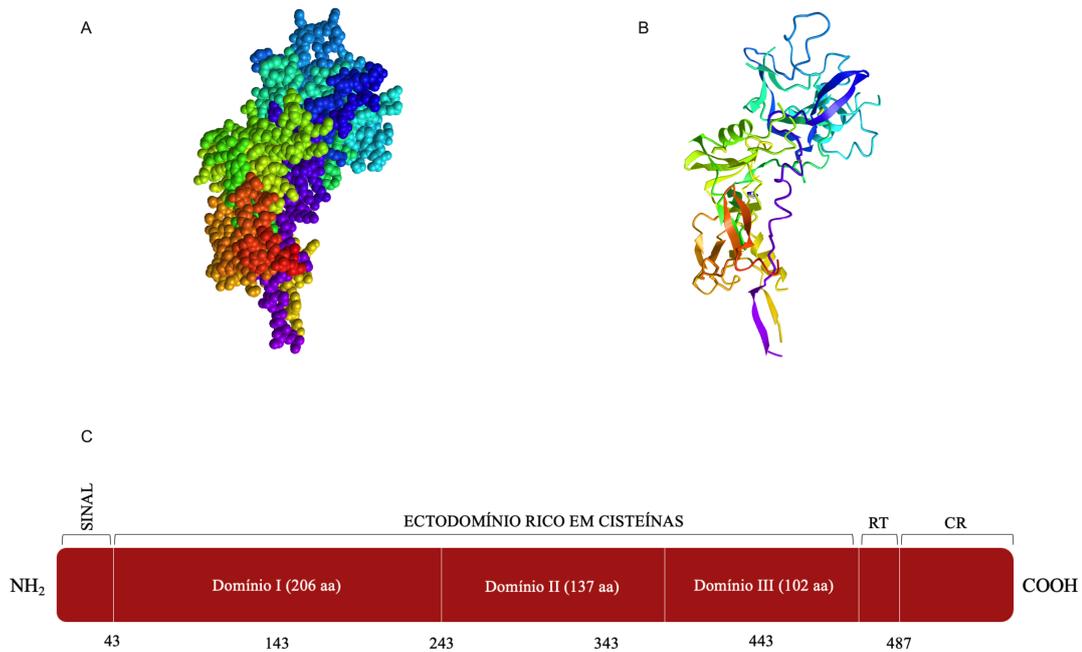


Figura 4: Diagrama esquemático da forma tridimensional (PDB:1W81) e dos domínios estruturais de *PvAMA-1* (Pizarro *et al.*, 2005).

Diversos estudos *in vitro* em parasitos do gênero demonstraram que a função dessa proteína poderia ser inibida e bloqueada quando na presença de anticorpos, interrompendo a progressão da infecção, confirmando seu papel vital no ciclo de vida do plasmódio. Ainda, a imunização experimental de roedores e primatas com a forma nativa de AMA-1 ou suas variações recombinantes resultou em desfecho protetor quando posteriormente os animais foram desafiados com o parasito (Stowers *et al.*, 2002). Já em seres humanos, anticorpos para AMA-1 são encontrados na maioria das pessoas com histórico de exposição à malária, com forte correlação com idade (quanto mais velhos e, portanto, maior tempo de exposição, maior a frequência de anticorpos). Contudo, estudos imunoepidemiológicos realizados em diferentes regiões do Brasil, Índia e Sri-Lanka demonstraram presença de imunidade naturalmente adquirida contra *PvAMA-1* mesmo em indivíduos com exposição limitada à doença (Wickramarachchi *et al.*, 2007; Seth *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2011). De forma interessante, anticorpos reconhecem, principalmente, DI e DII, enquanto que para regiões pertencentes ao DIII, as respostas são de menor robustez, embora aumentem progressivamente à medida que os indivíduos envelhecem. Significativamente, anticorpos IgG para construções vacinais contendo DI e DII de AMA-1 foram

associados com risco reduzido para malária clínica em indivíduos parasitêmicos (Polley *et al.*, 2004).

Quando comparado com outro candidato vacinal de estágio sanguíneo que também desperta bastante interesse, a MSP-1, anticorpos anti-AMA-1 parecem ser mais efetivos se avaliados quanto à capacidade funcional (inibição de crescimento do parasito) (Miura *et al.*, 2009). Se essas respostas funcionais observadas *in vitro* terão o mesmo desempenho *in vivo*, ainda está por se comprovar, porém os dados, sem dúvida, estimulam o interesse em AMA-1 como um importante e promissor candidato vacinal para a malária (Salavatifar *et al.*, 2015).

### 3.6.2 Famílias multigênicas de *Plasmodium* e a PvVir14

Várias espécies de *Plasmodium* possuem famílias multigênicas nas regiões teloméricas e subteloméricas de seus cromossomos (Janssen *et al.*, 2004). Em *Plasmodium vivax*, a maior família é conhecida como *vir* (variante de repetições intercaladas), e as proteínas pertencentes a ela são responsáveis pela variação antigênica do parasito em infecções naturais, ou seja, auxiliam no escape do parasito ao sistema imune do hospedeiro (tal ação pode resultar em infecções crônicas) (Requena *et al.*, 2016). Teoricamente, esses genes podem ser considerados como candidatos vacinais eficazes já que normalmente são expressos na superfície e, portanto, expostos ao sistema imune com frequência (Singh *et al.*, 2014). O repertório do gene *vir* a partir do genoma de *P. vivax* Sal-1 (cepa proveniente de El Salvador e a que atualmente mais circula no Brasil) inicialmente contemplava 346 genes, incluindo fragmentos e pseudogenes com diferentes números de exons (Del Portillo *et al.*, 2001; Fernandez-Becerra *et al.*, 2009). Mais tarde, mais de 1000 genes foram identificados em diferentes genomas de *P. vivax* (Auburn *et al.*, 2016). Estudos de modelagem probabilística, predição de proteínas e genes revelaram a existência de numerosas e distintas subfamílias (nomeadas de A – L) com padrões conservados entre elas (Carlton *et al.*, 2008). De forma interessante, estudos *in silico* dos domínios e estruturas secundárias de uma dessas subfamílias, a de nome A, revelaram que suas proteínas são bastante similares às proteínas da família SURFIN de *P. falciparum*, que são encontradas na superfície de merozoítos e eritrócitos infectados (Winter *et al.*, 2005).

As proteínas codificadas pelos genes *vir* ainda não têm papel conhecido, mas especula-se que tenham função mediando cito aderência e na cronicidade da doença (Fernandez-Becerra *et al.*, 2005). Ao contrário dos genes *var* de *falciparum* (família considerada homóloga), os genes *vir* são abundantemente expressos em determinados momentos do curso da infecção (Fernandez-Becerra *et al.*, 2005). Dentre as subfamílias já descritas (12 no total), a denominada Vir-14 é conhecida por ser capaz de gerar anticorpos específicos em infecções naturais, cuja presença está associada a um fator indicativo de exposição cumulativa à malária com tendência a um aumento durante episódios de infecção aguda (Requena *et al.*, 2014). Juntos, esses dados sugerem de forma contundente que as proteínas *vir* podem estar localizadas em regiões subcelulares distintas e exercendo funções diferentes, o que as tornam alvos de interesse.



## 4 OBJETIVOS

---

### 4.2 Objetivo geral

Identificar proteínas e peptídeos com potencial imunogênico envolvidos em infecções naturais por *Plasmodium vivax* para compor uma futura formulação vacinal multigênica.

#### 4.2.1 Objetivos específicos

- Selecionar epítomos lineares da proteína Pv-AMA-1 por biologia computacional;
- Identificar sequências proteicas de *P. vivax* em urinas de indivíduos naturalmente infectados;
- Produzir, por síntese química ou expressão heteróloga, peptídeos ou proteínas contendo as regiões imunogênicas previamente selecionadas; ;
- Determinar a antigenicidade dos peptídeos selecionados a partir de amostras de soros de pacientes naturalmente infectados por *P. vivax*;
- Avaliar o padrão de resposta celular induzida pela proteína PvVir14 em amostras de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax*.



## 5 METODOLOGIA

---

### 5.1 Populações e áreas de estudo

O presente estudo foi realizado com amostras provenientes de três países distintos: Brasil, Camboja e Mali. Todos os países contemplados são considerados endêmicos para malária, com populações naturalmente expostas embora se diferenciem com relação às espécies prevalentes e contexto de transmissão e tais características foram levadas em consideração para a escolha das áreas. No Brasil, onde majoritariamente circulam três espécies diferentes – *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* – foram contemplados aqueles indivíduos com infecção aguda por *P. vivax* que procuraram o serviço de saúde do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), Porto Velho, RO, nos anos de 2014 e 2019. Neste contexto, 121 amostras de soro e 22 amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram selecionadas. Em Camboja, as espécies circulantes no momento da coleta das amostras (2008) eram *P. vivax* e *P. falciparum* e, assim como no Brasil, somente aqueles indivíduos com infecção aguda para *P. vivax* foram elegidos. A escolha de Mali para parte do estudo foi estratégica considerando que, diferente do Brasil e de Camboja, na região de coleta não há circulação de *P. vivax*, o que torna os indivíduos incluídos (28) peças-chave na avaliação de resposta espécie-específica contra os antígenos investigados. Neste grupo foram incluídas amostras de indivíduos com infecção aguda por *P. falciparum*. As populações dos três países são compostas por adultos em sua maioria, embora a amplitude de faixa etária varie entre eles. Informações detalhadas e demais características epidemiológicas podem ser observadas na Tabela 2. Além de amostras de indivíduos infectados provenientes de áreas endêmicas, também foram incluídas no estudo 10 amostras de indivíduos controle de áreas não endêmicas – Belo Horizonte, MG, Brazil (15) e Bethesda, MD, Estados Unidos da América (5) – nunca antes expostos à doença para servir como controle nos estudos imunológicos. A coleta e utilização das amostras foi aprovada pelos comitês de ética em pesquisa de seus respectivos países sob os protocolos CAAE 27466214.0.0000.5149 (Brasil); ClinicalTrials.gov NCT00663546 (Camboja), e ClinicalTrials.gov NCT02334462 (Mali). Para alguns experimentos, amostras coletadas no Brasil foram congeladas e transportadas em gelo seco para o National Institutes of Health, Bethesda, EUA.

<b>Caracterização demográfica e epidemiológica</b>	
<b>Brasil: indivíduos infectados; <i>P. vivax</i> (n=121)</b>	
Faixa etária, anos	29 – 49
Sexo, feminino:masculino	1:3
<b>Brasil: indivíduos não infectados e nunca expostos (n=15)</b>	
Faixa etária, anos	26 – 32
Sexo, feminino:masculino	1:1.5
<b>Brasil: indivíduos não infectados, mas expostos (n=15)</b>	
Faixa etária, anos	20 – 47
Sexo, feminino:masculino	2.6 – 1
<b>Mali: indivíduos infectados; <i>P. falciparum</i> (n=28)</b>	
Faixa etária, anos	18–55
Sexo, feminino:masculino	1:3
<b>Cambodia: indivíduos infectados; <i>P. vivax</i> (n=55)</b>	
Faixa etária, anos	3–55
Sexo, feminino:masculino	1:1.75
<b>Estados Unidos da América: não infectados e nunca expostos (n=5)</b>	
Faixa etária, anos	49 – 53
Sexo, feminino:masculino	0:1

**Tabela 2** – Características epidemiológicas e demográficas dos indivíduos selecionados para o estudo.

## **5.2 Obtenção de plasma e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)**

Foram coletados cerca de 40mL de sangue em heparina sódica (tubos do tipo vacutainer, BD Vacutainer) por indivíduo. As amostras foram processadas imediatamente para obtenção de células mononucleares de sangue periférico. Dos 40mL de sangue heparinizado, 20mL foram diluídos em 10mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) incompleto (24 mM bicarbonato de sódio, 2mM L-glutamina, 25mM HEPES, 100U/ml penicilina e 0,017mM estreptomicina, pH 7,4), em tubo cônico de polipropileno de 50mL (tubo tipo Falcon). Em seguida, a suspensão sanguínea foi lentamente colocada sobre uma solução de histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), na proporção de 2:1 (tubo de 50mL), de modo a não romper a tensão superficial entre as duas camadas de densidades diferentes, e centrifugada (350 x g por 40 min a temperatura ambiente). Após a centrifugação, o anel de PBMCs, localizado na interface entre o plasma e o histopaque, foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo tipo Falcon de 50mL já contendo meio de cultura

RPMI 1640 incompleto gelado. Para a obtenção do plasma, o volume restante do sangue total (20 mL) foi processado nas mesmas condições acima, porém sem ser diluído com meio de cultura, sendo o sobrenadante coletado e o plasma estocado até uso (-20°C). Após a lavagem (350 x g por 10min a 4°C, 3x), as células foram ressuspendidas em soro bovino fetal (Gibco), contadas em câmara de Neubauer e diluídas para uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL em soro bovino fetal suplementado com 10% de dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma-Aldrich). A suspensão de PBMCs ( $1 \times 10^7$  células/mL por crio-tubo, cryopure, Sarstedt) foi congelada lentamente, inicialmente a -80°C por 24h, com ajuda de recipiente para congelamento contendo isopropanol (Nalgene).

### 5.3 PvAMA-1 – Seleção de epítomos com potencial imunogênico

A predição de epítomos lineares de células B foi realizada utilizando o programa BepiPred 1.0 conforme descrito anteriormente (Larsen *et al.*, 2006). De forma sintética, o software utiliza uma única sequência FASTA como entrada e cada aminoácido recebe um score de predição baseado no modelo de cadeia de Markov de antígenos já conhecidos e registrados na base de dados. Além disso, são incorporados métodos de escala de propensão com base na hidrofiliidade de cada aminoácido singular e na predição de suas estruturas secundárias. Foi utilizado um *cut-off* de 0.35 para definir se determinada região poderia ser considerada como um possível epítomo de célula B. O score dos epítomos representa a média dos scores encontrados para cada aminoácido singular que apresentou um valor acima do *cut-off* previamente instituído.

#### 5.3.1 Síntese e espectrometria de massa de peptídeos solúveis

Os peptídeos solúveis EEFRDYYENGEEKSNKQM (PI), SSGVRVDLGEDAEVENAK (PII), GDQRLKDGGFAFPNADDH (PIII) e SSGVRVDLGEDAEVENAKGDQKLKDGFFAFPNANDHEEFRDYENGEEKSNKQM (tripeptídeo) foram sintetizados em uma escala de 25 µmol no ResPep SL sintetizador automatizado (Intavis®). Os aminoácidos foram ativados com uma solução 1:1 de Oxyma Pure (Merk) e dissopropilcarbodiimida (DIC, Sigma-Aldrich). Em seguida, os aminoácidos ativados foram incorporados às resinas TentGel (Intavis) (Peptídeos I e II) ou 106 H-Rik Amide ChemMatrix (Sigma-Aldrich) (Peptídeos III e tripeptídeo). A

desproteção da Fmoc foi realizada repetidamente até que a síntese de cada peptídeo fosse completada utilizando 4-Methylpiperidine 25% (25% v/v em DMF). Os peptídeos foram então extraídos da resina através de um tratamento com uma solução contendo Trifluoroacetic (92,5%), água (2,5%), Triispropylsilane (2,5%) e Beta-mercaptoethanol (2,5%) em três horas sob agitação. Especificamente para o Tripeptídeo, a síntese foi realizada utilizando um agente cautrópico e cloreto de lítio (0.8M) e o tempo de desproteção foi prolongado de modo a garantir a extensão da cadeia polipeptídica. Os peptídeos foram precipitados com uma solução fria de metil terc butil e então liofilizados. O peso molecular de cada peptídeo sintetizado foi confirmado através de espectrometria de massa utilizando o equipamento MALDI/TOF Autoflex Speed.

### **5.3.2 Espectrometria de massa (MALDI/TOF)**

Para a análise, 0,5µL de amostra concentrada de cada peptídeo foi misturada com 0,25mL de uma solução de matriz saturada [10 mg / mL α-ciano-4-hidroxicinâmico (Aldrich, Milwaukee, WI) e 50% de acetonitrila/0,1% de ácido trifluoroacético. As amostras foram então aplicadas a uma placa MTP AnchorChip TM 600/384 (Bruker Daltonics) e deixadas para secar a temperatura ambiente. Os dados brutos foram obtidos no MALD/TOF Autoflex Speed utilizando um modo positivo/refletor controlado através do software FlexControlTM 3.3. A calibração do instrumento foi realizada utilizando peptídeos referência (Peptide Standard, Bruker Daltonics) e cada espectro foi produzido acumulando dados de 200 lasers consecutivos de 127 disparos.

### **5.4 PvVir14 – Peptídeo descoberto através de espectrometria de massa em urina de pacientes com infecção aguda por *P. vivax***

A identificação do peptídeo pertencente a uma proteína de *P. vivax* nunca antes descrita foi realizada a partir da urina de quatro pacientes diagnosticados com malária considerando os seguintes critérios: avaliação clínica consistente com a doença causada por esta espécie (por exemplo, febre e calafrios) além de microscopia laboratorial confirmatória e PCR. Todos os quatro pacientes eram procedentes do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) de Porto Velho, RO, Brasil e a coleta foi realizada antes do início do tratamento medicamentoso. As urinas foram congeladas imediatamente e enviadas para Taplin Mass Spectrometry Facility,

Harvard Medical School, Boston, MA para serem processadas e analisadas (CAAE 27466214.0.0000.5149).

#### **5.4.1 Análise das urinas por espectrometria de massa**

Amostras de urina (15ml/indivíduo) foram descongeladas, centrifugadas e filtradas a 0.2µm. Posteriormente, foram concentradas para um volume final entre 200 e 300µl utilizando filtros Centricon P3 (3kDa). As amostras foram então misturadas em partes iguais a um tampão de amostra de eletroforese e submetidas a um SDS-PAGE seguido de coloração por comassie. Bandas com tamanho entre 5kDa e 75kDa foram excisadas do gel e para cada amostra de urina, entre 8 e 10 bandas foram extraídas do gel para uma análise independente. As bandas foram digeridas com tripsina de modo a transformar o material em peptídeos, que foram posteriormente analisados por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa. Uma análise *in silico* prevendo padrões específicos de peptídeos de proteínas já identificadas a partir dos projetos genômicos humano e de protozoários *Plasmodium* foi realizada de modo a detectar sequências de interesse. O *cut-off* para escolha dos peptídeos foi definido a partir do valor de correlação cruzada (XCorr) de 1.8 para íons unicamente carregados, 2.5 para íons duplamente carregados e 3.0 para íons triplamente carregados. Além disso, foram considerados valores de correlação delta (DelCn) de 0.1 e um Rank/Sp (RSP) de 1. Os valores de correlação cruzada escolhidos para cada peptídeo garantem uma correspondência de alta confiabilidade uma vez que contempla diferentes estados de carga, enquanto o *cut-off* por DelCn certifica a exclusividade do peptídeo identificado. Já o RSP assegura uma pré-classificação dos peptídeos levando em consideração os critérios necessários e excluindo todos aqueles que não performaram bem nas análises iniciais.

#### **5.5 Expressão das proteínas PvAMA-1 e PvVir14**

As proteínas PvAMA-1 (546 aminoácidos) e PvVir14 (325 aminoácidos) foram expressas em *Escherichia coli* conforme previamente descrito (Bueno *et al.*, 2011; Dhom-Lemos *et al.*, 2019). Os plasmídeos recombinantes contendo os genes sintéticos pUC57/AMA-1 e pUC57/PvVir14 (GenScript) foram ressuspensos e transformados em células competentes de *Escherichia coli* XL-1 Blue (Phoneutria, Brasil). Os clones positivos foram digeridos com as enzimas XhoI e NheI e os

respectivos insertos foram subclonados em um vetor de expressão bacteriano pET28aTEV. Bactérias *E. coli* BL21 star eletrocompetentes (Thermo Fisher Scientific, EUA) foram transformadas com os plasmídeos recombinantes por eletroporação utilizando um MicroPulser Electroporation Apparatus (Bio-Rad Laboratories, EUA). A inserção correta dos genes foi confirmada através de PCR de colônia com os primers T7 (Macrogen, Coreia do Sul). A expressão das proteínas em larga escala foi obtida após a adição de 1mM de isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) e consequente incubação por 3 horas a 37°C/180rpm. As células foram rompidas por um sistema homogeneizador de alta pressão e as frações solúveis foram obtidas por centrifugação. As proteínas recombinantes foram purificadas utilizando uma coluna de níquel (HisTrap HP GE HealthCare, EUA) acoplada ao sistema AKTA Prime Plus de purificação (GE Healthcare, EUA). As proteínas purificadas com 62kda e 38kda (*PvAMA-1* e *PvVir14* respectivamente) foram separadas por SDS-PAGE.

## **5.6 Ensaio sorológicos para *PvVir14*, *PvAMA-1*, PI, PII, PIII e tripeptídeo**

### **5.6.1 Detecção de anticorpos IgG e IgM por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

A presença de anticorpos IgG e IgM contra *PvVir14* e anticorpos IgG contra *PvAMA-1* e os 4 peptídeos preditos *in silico* foi determinada através de ensaio imunoenzimático convencional (ELISA) realizado como descrito a seguir: placas de 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos antígenos diluídos em tampão carbonato nas concentrações de 0.5 $\mu$ g/mL para *PvVir14* e *PvAMA-1* e 2 $\mu$ g/poço para os peptídeos I, II, III e tripeptídeo e incubados *overnight* (4°C para as proteínas; 37°C para os peptídeos). Subsequentemente, as placas foram lavadas (PBS 1x pH 7.2 + 0,05% *Tween*) e bloqueadas (PBS 1x pH 7.2 + 3%BSA) por 2 horas em temperatura ambiente. O anticorpo primário (soro de indivíduos com infecção aguda e não infectados/controles) foi diluído na concentração de (i) 1:500 para IgG contra *PvVir14*; (ii) 1:100 para IgM contra *PvVir14*; (iii) 1:100 para IgG contra *PvAMA-1* e os quatro peptídeos sintéticos; e incubados por duas horas em temperatura ambiente sob agitação. As placas foram então lavadas 4 vezes com PBS 1x + 0,05 *Tween* e um anticorpo secundário conjugado com peroxidase HRP (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado nas seguintes concentrações: 1:10000 (IgG) e 1:8000 (IgM). As placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação e,

posteriormente, lavadas mais 4 vezes com PBS 1x + 0,05 Tween antes do substrato cromogênico (3,3'5'5 Tetrametilbenzidina, TMB SeraCare™) ser adicionado a cada poço. A reação foi interrompida após 15 minutos através da adição de solução de parada (SeraCare™). Os valores de *cut-off* foram obtidos testando soros controle de indivíduos não infectados e nunca expostos de regiões não endêmicas do Brasil (Belo Horizonte, MG) e dos Estados Unidos da América (Bethesda, MD). A densidade óptica média de  $492 \pm 3$  DS (VersaMax™ 160 Microplate Reader) dos controles em duplicata foi utilizada para estabelecer os pontos de corte das proteínas e peptídeos.

### 5.6.2 Detecção de subclasses de IgG por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os ensaios de ELISA para detectar as subclasses de IgG foram realizados conforme descrito anteriormente (Bueno *et. al*, 2011). Os soros foram diluídos a 1:50 para *PvVir14* e a 1:100 para *PvAMA-1* e os 4 peptídeos e avaliados utilizando anticorpos monoclonais de camundongo para as subclasses de IgG humana (IgG 1 clone 8c6-39; IgG 2 clone HP-6014; IgG 3 clone HP6050; IgG 4 clone HP-6025) (Sigma, St.Louis, MO) de acordo com instruções do fabricante. A ligação do anticorpo monoclonal foi detectada através de substrato cromogênico (3,3'5'5 Tetrametilbenzidina, TMB SeraCare™, KPL) e o *cut-off* foi determinado através de soros de controle negativo de diferentes indivíduos nunca antes expostos à malária (Belo Horizonte, MG, Brasil e Bethesda, MD, Estados Unidos da América). A densidade óptica média de  $492 \pm 3$  DS (VersaMax™ 160 Microplate Reader) dos controles em duplicata foi utilizada para estabelecer os pontos de corte das proteínas e peptídeos/subclasses de IgG.

### 5.6.3 Elisa de depleção para *PvAMA-1* e peptídeos sintéticos

As ELISAS de depleção foram realizadas conforme descrito anteriormente (Santiago *et al.*, 2011). Resumidamente, placas de fundo chato de 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas com 2µg/poço com os peptídeos EEFRDYYENGEEKSNKQM (PI), SSGVRVDLGEDAEVENAK (PII), GDQRLKDGGFAFPNADDH (PIII) e SSGVRVDLGEDAEVENAKGDQKLKDGGFAFPNANDHEEFRDYYENGEEKSNKQM (tripeptídeo) e mantidas overnight a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas e bloqueadas, os soros foram adicionados na placa a uma concentração de 1:100 e incubados a 37°C overnight. No dia seguinte, os soros foram transferidos para placas

previamente sensibilizadas com PvAMA-1 (0,5µg/mL) e o ensaio prosseguiu como descrito no tópico 4.5. 1.

### **5.7 Ensaio sorológicos para demais proteínas (*Pvs230D1M*, *PvDBP-RII*, *PvCSP*)**

As respostas de anticorpos contra *Pvs230*, *PvDBP-RII* e *PvCSP* foram determinadas por ensaio imunoenzimático de ELISA e executadas de acordo com protocolo estabelecido no Laboratório de Vacinologia e Imunologia da Malária (National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos da América). Detalhes da produção e purificação das proteínas *Pvs230* (Sal-1, sequência de referência NCBI XP\_001613020.1), *PvCSP* (CSP31VK210, referência NCBI KT588189.1) (ambas expressas em *P. pastoris*), e *PvDBP-RII* (expressa em *E.coli* BL-21) foram descritos anteriormente (Urusova *et al.*, 2019). Placas Immunolon® 4HBX de 96 poços foram sensibilizadas com 1µg/mL de antígeno e incubadas *overnight* a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com solução contendo PBS 1x + 3% BSA e lavadas 4 vezes com PBS1x + 0,05% Tween. Após estabelecer diluições mínimas de soro para detectar reatividade contra os antígenos em estudo (1:10µl para *Pvs230*; 1:100 para *PvDBP-RII* e 1:250 para *PvCSP*), amostras de soro foram adicionadas aos poços previamente sensibilizados e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com 100µl de anti-IgG humano (1:2000, SeraCare™, KPL) por 2 horas em temperatura ambiente. Após nova lavagem, os poços foram incubados com substrato colorimétrico (P-nitrofenil fosfato, Sigma, St.Louis, MO) por 15 minutos e as absorbâncias medidas utilizando o leitor SoftMax Pro7 (Molecular Devices). O ponto de corte para definir a positividade foi definido com base na densidade óptica média (OD) de amostras de indivíduos nunca expostos à malária mais  $\pm 3$  DS.

### **5.8 Citometria de fluxo para caracterizar PBMCs de indivíduos infectados, tratados e expostos à *P. vivax***

Células nucleares do sangue periférico (PBMCs) foram descongeladas a 37°C em banho-maria e ressuspendidas em RPMI completo para o processo de lavagem e depois em PBS 1x. As células foram marcadas com anticorpos específicos para os

seguintes marcadores conjugados com fluoróforos (BioLegend): CD3 FITC (clone SK7), CD4 Percp-Cy5.5 (clone SK3), CD8 APC-Cy7 (clone SK1), CD14 AlexaFluor700 (clone HCD14), CD16 PE-Cy7 (clone 3G8), CD19 BV605 (clone HIB19), CD21 BV711 (clone B-ly4), CD27 APC (clone LG3A10) e CD56 BV785 (clone 5.1H11). Além desses, um outro anticorpo (BD Biosciences) também foi utilizado: CD21 BV711. As células também foram marcadas com Zombie UV™ de modo a diferenciar células vivas de mortas. Em seguida, as células foram incubadas a 4°C protegidas da luz por 20 minutos para garantir o processo de marcação, lavadas com PBS 1x e então ressuspendidas em tampão FACS (BD Biosciences). A citometria de fluxo foi realizada no instrumento LSRII (BD Biosciences) do Laboratório de Vacinologia e Imunologia da Malária no National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos da América.

Um gating strategy (Figura X) foi realizado de modo a identificar (i) células únicas (singlets); (ii) células vivas; e então (iii) células específicas do sistema imune. Estas foram separadas da seguinte forma: monócitos como células CD14+, células B como linfócitos CD19+, células T como linfócitos CD3+, células T CD4+ como CD3+ CD4+, células TCD8+ como CD3+ CD8+, células NKT-like como CD3+ CD56+, células B de memória ativadas como CD19+ CD 21- CD27+, células B de memória clássicas como CD19+ CD21+ CD27+, células B naive como CD19+ CD21+ CD27- e células B de memória atípicas como CD19+ CD21- CD27-.

### **5.9 Sequenciamento dos genes V (VDJ) de células B de memória para *P. vivax***

A amplificação das cadeias pesadas e leves das células B foi realizada pela iRepertoire Inc. (Huntsville, AL, EUA). Uma PCR de transcrição reversa 1 (RT-PCR1) foi realizada de forma *nested*, utilizando um multiplex de primers cobrindo as cadeias pesadas e leves (kappa e lambda), incluindo adaptadores de fragmentos (Illumina Inc.). Depois da RT-PCR1, os produtos foram coletados utilizando SPRISelect Beads (Beckman Coulter, Brea, EUA). Uma segunda PCR foi realizada com primers de indexação dupla que completam os adaptadores de sequenciamento previamente introduzidos durante a PCR1 de modo a fornecer informações sobre a posição dos produtos sequenciados na placa. O sequenciamento então foi realizado utilizando o kit Illumina MiSeq v2 500 ciclos com 250 leituras de extremidades emparelhadas.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

A seção de resultados e discussão está representada sob a forma de artigos publicados em revistas indexadas, que se encontram anexados na ordem a seguir:

1. Fantin RF, Fraga VG, Lopes CA, de Azevedo IC, Reis-Cunha JL, Pereira DB, Lobo FP, Oliveira MM, dos Santos AC, Bartholomeu DC, Fujiwara RT, Bueno LL (2021). New highly antigenic linear B cell epitope peptides from *PvAMA-1* as potential vaccine candidates. *PLoS ONE* 16(11): e0258637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637>.
2. Fantin RF, Abeijon C, Pereira DB, Fujiwara RT, Bueno LL, Campos-Neto A (2022). Proteomic analysis of urine from patients with *Plasmodium vivax* malaria unravels a unique *Plasmodium vivax* protein that is absent from *Plasmodium falciparum*. *Trop. Med. Infect. Dis.*, v. 7, p. 314. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7100314>.
3. Fantin RF, Coelho CH, Berhe AD, Magalhães LMD, Salinas ND, Tolia NH, Amaratunga C, Suon S, Sagara I, Narum DL, Fujiwara RT, Abeijon C, Campos-Neto A, Duffy PE, Bueno LL (2023). Immunological characterization of a VIR protein Family member (VIR-14) in *Plasmodium vivax*-infected subjects from different epidemiological regions in Africa and South America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.17p. e0011229. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229>.

## 6.1 New Highly antigenic linear B Cell epitope peptides from PvAMA-1 as potential vaccine candidates

PLOS ONE

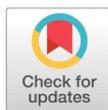
RESEARCH ARTICLE

### New highly antigenic linear B cell epitope peptides from PvAMA-1 as potential vaccine candidates

Raianna F. Fantin<sup>1,2</sup>, Vanessa G. Fraga<sup>1</sup>, Camila A. Lopes<sup>1</sup>, Isabella C. de Azevedo<sup>1</sup>, João L. Reis-Cunha<sup>3</sup>, Dhelio B. Pereira<sup>4</sup>, Francisco P. Lobo<sup>1</sup>, Marcela M. de Oliveira<sup>4</sup>, Anderson C. dos Santos<sup>1</sup>, Daniela C. Bartholomeu<sup>1</sup>, Ricardo T. Fujiwara<sup>1</sup>, Lillian L. Bueno<sup>1\*</sup>

**1** Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **3** Department of Preventive Veterinary, Medicine Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **4** Tropical Medicine Research Center, Porto Velho, Rondônia, Brazil

\* llbueno@icb.ufmg.br



#### OPEN ACCESS

**Citation:** Fantin RF, Fraga VG, Lopes CA, de Azevedo IC, Reis-Cunha JL, Pereira DB, et al. (2021) New highly antigenic linear B cell epitope peptides from PvAMA-1 as potential vaccine candidates. PLoS ONE 16(11): e0258637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637>

**Editor:** Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, BRAZIL

**Received:** February 1, 2021

**Accepted:** October 1, 2021

**Published:** November 2, 2021

**Copyright:** © 2021 Fantin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This investigation received financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG, Brazil (Grant# CBB APO-00766-18), the Brazilian National Research Council (CNPq) (Grant# 421392/2018-5, Grant# 312151/2020-9), and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. DCB, RTF and LLB are Research

#### Abstract

Peptide-based vaccines have demonstrated to be an important way to induce long-lived immune responses and, therefore, a promising strategy in the rational of vaccine development. As to malaria, among the classic vaccine targets, the Apical membrane antigen (AMA-1) was proven to have important B cell epitopes that can induce specific immune response and, hence, became key players for a vaccine approach. The peptides selection was carried out using a bioinformatic approach based on Hidden Markov Models profiles of known antigens and propensity scale methods based on hydrophilicity and secondary structure prediction. The antigenicity of the selected B-cell peptides was assessed by multiple serological assays using sera from acute *P. vivax* infected subjects. The synthetic peptides were recognized by 45.5%, 48.7% and 32.2% of infected subjects for peptides I, II and III respectively. Moreover, when synthesized together (tripeptide), the reactivity increases up to 62%, which is comparable to the reactivity found against the whole protein PvAMA-1 (57%). Furthermore, IgG reactivity against the tripeptide after depletion was reduced by 42%, indicating that these epitopes may be responsible for a considerable part of the protein immunogenicity. These results represent an excellent perspective regarding future chimeric vaccine constructions that may come to contemplate several targets with the potential to generate the robust and protective immune response that a vivax malaria vaccine needs to succeed.

#### Introduction

Malaria disease represents a huge challenge for public authorities in Brazil and in the world-wide. Of the species that infect humans, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* are considered to be the most important from a public health point of view. While deaths and several cases are mostly reported coming from *P. falciparum* infection, *P. vivax* is responsible for causing 90% of cases registered outside Africa. In 2019, an estimated 229 million cases of

Fellows (Bolsa de Produtividade em Pesquisa) from CNPq.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

malaria occurred worldwide [1]. Specifically in Brazil, 194,000 cases were reported in the same period and *P. vivax* stands out being responsible for around 80% of those [2]. This species is particularly challenging for malaria control not only because of its wider global distribution but also because of its high frequency of sub-microscopic infections, and ability to produce relapses from long-lasting liver-stages infections [3, 4].

In the last decades, efforts have been made to develop vaccines against different stages of *P. vivax*. Among the classic targets, the Apical membrane antigen (AMA-1), a transmembrane protein located in the micronemes of the parasite and present in all species of *Plasmodium*, is a promising target to induce a protective immune response as demonstrated in rodent and non-human primates' experimental models [5]. Among its functional aspects, the mediation of parasite internalization within the host cell through a structure formed by AMA-1 and the erythrocyte complex of proteins named Rhoptry Neck (RON), is one of the most remarkable [6–8]. There is strong evidence that antibodies and peptides against the junction formed by these two molecules can inhibit the invasion of parasites in the erythrocytes of human hosts [5, 9]. Furthermore, specifically regarding *P. vivax* AMA-1 (PvAMA-1), immuno-epidemiological studies conducted in different endemic regions of Brazil, India and Sri-Lanka have demonstrated a naturally acquired immune response to this protein even in individuals with limited exposure to the disease [10, 11]. Of note, a linear epitope derived from the domain II of PvAMA-1 was identified through bioinformatic analysis and synthetic production [7] and the favorable data support for the development of a PvAMA-1-based subunit vaccine against malaria vivax infection. Indeed, the identification of highly immunogenic peptides through bioinformatic tools is one of the most promising [12, 13]. Developing peptide-based antigens may have numerous advantages. Amidst them, the most important ones navigate through cost, stability, easy reproducibility, capacity in result specific immune response and the possibility to generate chimeras containing multiple epitopes that might be relevant [14]. Moreover, antigens that are peptide-based have demonstrated to be able to induce long-lived immune responses since they can be customized to aim very specific targets [15].

In this context, the identification of immunodominant targets that allows the development of vaccines against *P. vivax* may be critical in the success of a research agenda to underpin malaria control and elimination. Here we present three new highly antigenic linear B cell epitope peptides within the PvAMA-1 as potential vaccine candidates. They have showed to be strong candidates when assessed individually or as a multi-component antigen, with an immunogenicity that is equivalent to the entire PvAMA-1 protein.

## Methods

### Study population, sera samples and ethical statements

The study population included 121 individuals living in the Brazilian Amazon area who were diagnosed with vivax malaria at the Research Center for Tropical Medicine (CEPEM) in Porto Velho, Rondônia, Brazil, in the years of 2014 (Jul) and 2019 (Nov–Dec). The volunteer's inclusion criteria in this study group was (i) to have an acute infection at the moment of blood sampling; (ii) be over 18 years of age and (iii) to be willing to participate in the study. Considering that the subjects participating in the study were chosen as they sought the city's health service, the selection was random, in a way that allowed each member of the larger group—the population of Porto Velho—to have an equal chance of being chosen. Although certain characteristics such as occupation and place of residence have been shown to be of importance in the rate of infection in other studies [16–18], since certain environments can lead to greater exposure to the vector (farmers, rural households, etc.), in this study no relationship was observed between occupation/residence and malaria incidence. Fifteen healthy individuals from Belo Horizonte,

Minas Gerais State, Brazil, a non-endemic area for malaria, were also recruited as controls. Each volunteer was required to sign a written informed consent specific to this study, and blood was obtained upon receiving the said document. The research was approved by the Research Ethics Council of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CAAE 27466214.0.0000.5149).

### Peptide selection

The prediction of B cell linear epitopes was carried out using the program BepiPred 1.0 as described before [10]. Briefly, the software takes a single sequence in FASTA format as input, and each amino acid receives a prediction score based on Hidden Markov Models profiles of known antigens and incorporates propensity scale methods based on hydrophilicity and secondary structure prediction. The lowest cut-off of 0.35 was used in order to consider a given region as a valid linear B cell epitope. The epitope score represents the average of the scores of individual amino acids above the cut-off.

**Peptide conservation evaluation.** To evaluate the conservation of the selected peptides, a total of 218 PvAMA-1 sequences were recovered from PlasmoDB [19]. Out of those, only sequences with a read depth coverage higher than 30 and with at least 90% of its reads mapping to the reference were selected, using the metadata provided by PlasmoDB. Next, sequences that had 10 or more "N"s were removed, using in-house Perl scripts, resulting in a final selection of 64 sequences for downstream analysis. These 64 sequences were aligned using MAFFT v7.427 [20], with—maxiterate 1000—globalpair—adjustdirection—reorder options. The aligned sequences were then translated with SeqKit translate v.0.12.0 [21], and the conservation estimation, plots, tables, and logo images were generated in R (<https://www.R-project.org/>), using the following libraries: seqinr [22], ggplot2, and ggseqlogo [23].

### Synthesis and mass spectrometry of soluble peptides

The soluble peptides EEFRDYYENGEEKSNKQM (PI), SSGVRVDLGEDAEVENAK (PII), GDQRLKDGGFAPFNADDH (PIII) and KLKDGGFAPFNANDHEEFRDYYENGEEKSNKQM (tripeptide) were synthesized on a 25  $\mu$ mol scale in the ResPep SL automated synthesizer (Intavis<sup>®</sup>). Briefly, Fmoc-amino acids were activated with a 1:1 solution of Oxyma Pure (Merk) and diisopropylcarbodiimide (DIC, Sigma-Aldrich). The active amino acids were incorporated into TentGel (Intavis) (Peptides I and II) or H-Rink Amide ChemMatrix (Sigma-Aldrich) (Peptide III and Tripeptide) resins. Fmoc deprotection was performed using 25% 4-methylpiperidine (25% v/v in DMF). These steps were repeated until the synthesis of each peptide was completed. The peptides were deprotected and released from the resin by treatment with a solution of 92.5% trifluoroacetic acid, 2.5% water, 2.5% triisopropylsilane and 2.5% beta-mercaptoethanol during 3 hours under agitation. Specifically, for the Tripeptide the synthesis was performed using a chaotropic agent and lithium chloride (0.8M). The time of deprotection was prolonged in order to guarantee the proper extension of the polypeptide chain. The peptides were precipitated with cold methyl tert-butyl ether and lyophilized. The molecular weight of each peptide synthesized was confirmed by mass spectrometry using Autoflex Speed MALDI/TOF equipment.

### Mass spectrometry (MALDI/TOF)

For the analysis, 0.5  $\mu$ L of the concentrated sample was mixed with 0.25 mL of a saturated matrix solution 10 mg/mL  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic (Aldrich, Milwaukee, WI) in 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid. The samples were applied to a MTP AnchorChip<sup>™</sup> 600/384 plate (Bruker Daltonics) and left to dry at room temperature. The raw data was obtained by

MALDI-TOF/TOF Autoflex III™ (Bruker Daltonics, Billerica, USA) using a positive/reflector mode controlled by FlexControl™ 3.3 software. The instrument calibration was performed using reference peptides (Peptide Standard, Bruker Daltonics). Each spectrum was produced by accumulating data from 200 consecutive laser shots.

### Expression and purification of the Apical membrane Protein 1 (PvAMA-1/Sa1-1)

The protein representing amino acids 1 to 546 of AMA-1 was expressed in *Escherichia coli*, as previously described [10, 24]. Briefly, the recombinant plasmid containing pUC57/AMA-1 synthetic gene (GenScript) was resuspended and transformed with competent cells from *Escherichia coli* XL-1 Blue (Phonutria, Brazil). After positive clones were confirmed by digestion with the enzymes *XhoI* and *NheI*, the AMA-1 insert was subcloned into a bacterial expression vector pET28aTEV. Electrocompetent *E. coli* BL21-Star (Thermo Fisher Scientific, USA) cells were transformed with the recombinant plasmid pET28a-TEV/AMA-1 by electroporation using a MicroPulser Electroporation Apparatus (Bio-Rad Laboratories, USA). Correct gene insertion was confirmed by colony PCR and using T7 primers (Macrogen, South Korea). Protein large scale expression was obtained after the addition of 1mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and incubation for 3 h at 37°C at 180rpm. Cells were ruptured by a high-pressure homogenizer and soluble fractions were obtained by centrifugation. The recombinant protein was purified using Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography with HisTrap HP 5 mL column (GE Healthcare, USA) coupled to an ÄKTA Prime Plus system (GE Healthcare, USA). The purified AMA-1 protein, having 546 amino acids and predicted molecular weight of 62kDa, was separated by SDS-PAGE.

### Serological assays

**Total IgG.** The presence of IgG antibodies against PvAMA-1 protein and all four peptides were determined through a conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that was performed as previously described [10, 25]. Briefly, the microplates (Costar®) were coated with the antigens (concentrations of 0.5μg/mL and 2μg/well for PvAMA-1 and peptides respectively) and incubated overnight at 4°C for PvAMA-1 and at 37°C for peptides. Subsequently, the plates were washed and blocked (PBS 1x pH 7.2 + 3% BSA). All samples were diluted 1:100 and evaluated for total IgG using peroxidase-conjugated anti-human IgG antibodies at a concentration of 1:10,000 (Catalog No. W4031) (Promega Corporation). Monoclonal antibody binding was detected with OPD substrate tablets (Thermo Fisher Scientific, USA). The *cut-off* value was obtained by testing 15 different negative control sera from individuals never exposed to malaria from Belo Horizonte, Brazil. The mean optical density value at 492 nm ± 3 SD (VersaMax™ Microplate Reader) for duplicate determinations in negative sera was used as the *cut-off* value for different peptides.

**IgG subclasses.** The ELISA to detect the IgG subclasses was performed as previously described [10]. The sera were diluted 1:100 and evaluated for each IgG subclass using mouse monoclonal antibodies to human IgG subclasses (IgG1 clone 8c/6-39; IgG2 clone HP-6014; IgG3 clone HP-6050; IgG4 clone HP-6025) (Sigma, St. Louis, MO) according to the manufacturer instructions. Specifically, the secondary antibody dilutions were 1:1,000, 1:15,000, 1:40,000 and 1:60,000 for IgG 1, IgG 2, IgG 3 and IgG 4 respectively. The *cut-off* value was obtained by testing 6 different negative control sera from individuals never exposed to malaria from Belo Horizonte, Brazil. Monoclonal antibody binding was detected with OPD substrate tablets (Thermo Fisher Scientific, USA). The mean optical density value at 492 nm±3 SD

(VersaMax™ Microplate Reader) for duplicate determinations in negative sera was used as the cut-off value for different subclasses and peptides.

### Depletion ELISA

The depletion ELISAs were performed as previously described [26]. Briefly, flat-bottom plates (Costar, USA) were coated overnight with 2 µg/well of the peptides EEFRDYENGEEKSNKQM (PI), SSGVRVDLGEDAEVENAK (PII), GDQLKDGGFAPNADDH (PIII) and SSGVRVDLGEDAEVENAKGDQKLDGGFAPNANDHEEFRDYENGEEKSNKQM (tripeptide), then washed and blocked as described. Sera were added to the plates at a 1:100 dilution and incubated at 37°C overnight. On the following day, sera were transferred to plates coated overnight with PvAMA-1 (0.5 µg/mL) after appropriate washing and blocking.

### Statistical analysis

All statistics were carried out using Graphpad Prism 8 for iOS (Graphpad Software, Inc.). In order to determine whether a variable was normally distributed, we used Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Sminorff tests. The frequency and association between IgG antibody response (total and subclasses) to PvAMA-1 and all four peptides was determined by Fisher's exact test. P values for the depletion ELISA were determined by Wilcoxon matched pairs test. All p values <0.05 were considered significant.

## Results

### Epidemiological profile of studied individuals

The study population is composed of 121 individuals residing in the city of Porto Velho (Rondônia) and neighboring municipalities (Table 1). The majority is composed of adult individuals naturally exposed to the malaria parasite and the age range was 29--49 with an average of 39 years old. The gender ratio was 1:3 (female: 23.9%; male: 76.1%). Regarding previous malaria infections, the majority of them have had both most prevalent species currently circulating in Brazil: *P. falciparum* and *P. vivax* (44.6%), following by those who have only been infected with *P. vivax* (37.2%); with none of them (15.7%) and finally, only with *P. falciparum* (1.65%). In general, the parameters, that might differ depending on gender and occupation, indicate that individuals are frequently exposed to malaria. The control population was comprised of 15 non-exposed and never infected individuals living in a non-endemic area. These

**Table 1. Epidemiological and demographic characterization of infected subjects from endemic area (2014/2019), n = 121.**

Median age, years (IQR) <sup>a</sup>	39 (28–49)
Gender, female:male	1:3
% of individuals previously infected with malaria	86.8% (105)
Previous malaria episodes, median (IQR)	5 (2–11)
<i>Plasmodium vivax</i>	37.2% (45)
<i>Plasmodium falciparum</i>	1.65% (2)
<i>P. vivax</i> and <i>P. falciparum</i>	44.6% (54)
None	15.7% (19)

Epidemiological and demographic characteristics of the 121 individuals selected for the study from a malaria endemic region (Porto Velho, Rondônia, Brazil).

<sup>a</sup>IQR: Interquartile range.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637.t001>

**Table 2. Epidemiological and demographic characterization of non-infected subjects/controls from non-endemic area (2019), n = 15.**

Median age, years (IQR) <sup>a</sup>	28 (26.5–33)
Gender, female:male	1.6:1
% of individuals previously infected with malaria	0 (0)
Previous malaria episodes, median (IQR)	0 (0)

Epidemiological and demographic characteristics of the 15 individuals selected for the study from a malaria free area (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil).

<sup>a</sup>IQR: Interquartile range.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637.t002>

individuals had an age range of 26.5–33, with an average of 28 years. The gender ratio was (female: 61.53% male: 38.46%) (Table 2).

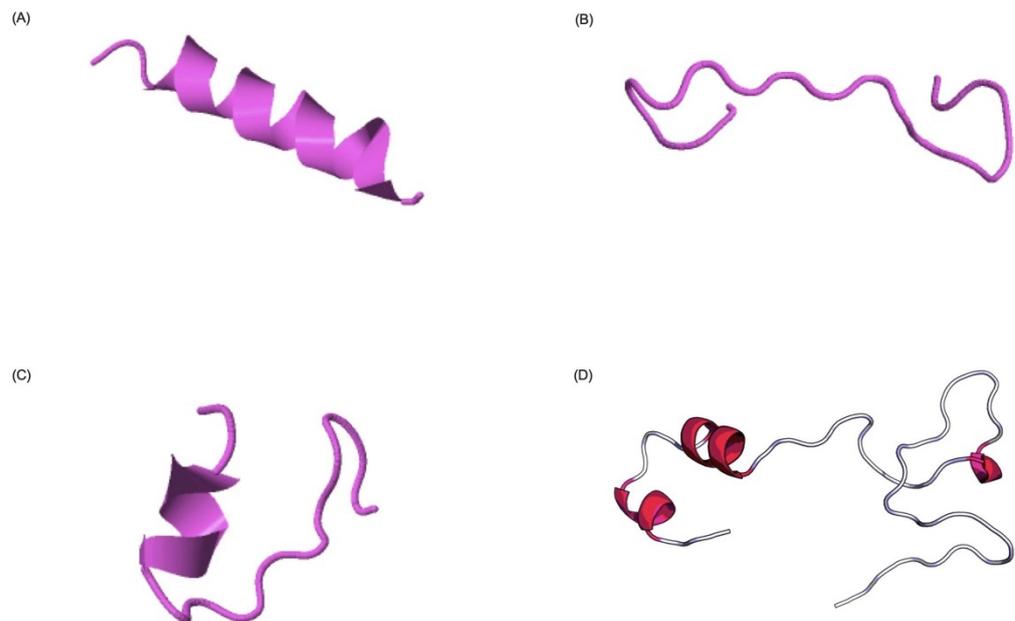
### Prediction results, chemical synthesis, and quality assessment of selected peptides

The predicted peptides were found to be distributed within two of the three PvAMA-1 domains, being PI part of domain III, and P II and III part of domain I. An analysis conducted using PlasmoDB sequences confirmed that the peptides are well conserved (Fig 1), with little or no variation in amino acids positions (S1 Fig, S1 Table), especially PI, which demonstrated to be 100% conserved in all assessed isolates. The molecular weights (MW) of each specie were accessed in PepCalc.com-- Peptide calculator (Innovagen™) namely: PI (2295.4 g/mol), PII (1873.97 g/mol), PIII (1930.04 g/mol) and Tripeptide (6065.35 g/mol). All MW were experimentally confirmed through characterization of the synthetic peptides by MALDI-TOF-TOF (S2 Fig). It is possible to observe the isotopic envelope of the small molecules (PI, PII and PIII) in the graphs (S2A–S2C Fig respectively), since it was able to use the reflector mode in their characterization. It wasn't possible to observe the isotopic envelope of the largest species-tripeptide--whereas the linear mode with lower resolution was used in the characterization, considering the reduced ionization capacity of this molecule. The tridimensional structure of each peptide was predicted using two different software: i-TASSER for smaller peptides (Fig 2A–2C) and RaptorX for the bigger one, as shown in Fig 2D [27–31]. We observed that PI and PII exhibits some regions in  $\alpha$ -helix despite their small sizes and their secondary structures are partially preserved in the Tripeptide.



**Fig 1. Logo representation of the amino acid conservation of the selected peptides in 64 *P. vivax* isolates from PlasmoDB.** The frequency of each amino acid in each position is represented by the size of its corresponding letter. Each colour corresponds to a physicochemical property.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637.g001>

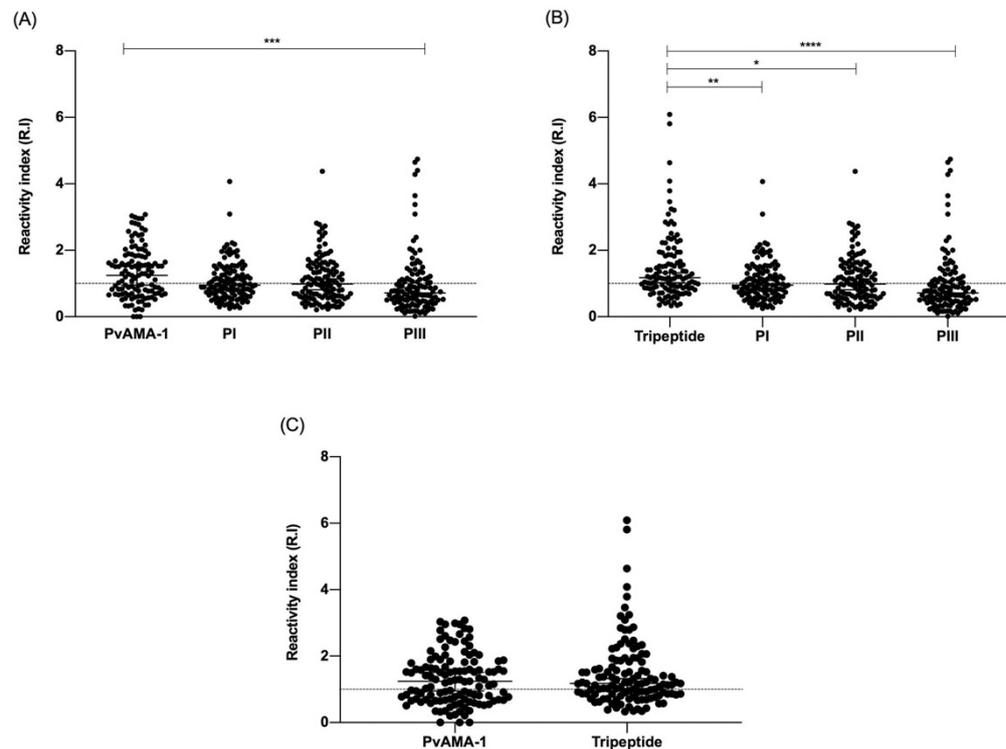


**Fig 2. Predicted secondary structure of the synthetic peptides.** (A) Peptide I (EEFRDYYENGEEKSNKQM): helix and coil dominance. (B) Peptide II (SSGVRVDLGEDAEVENAK): Strand and coil dominance. (C) Peptide III (GDQRLKDGGFAPNADDH): coil dominance. (D) Tripeptide (SSGVRVDLGEDAEVENAKGDQKLDGGFAPNANDHEEFRDYYENGEEKSNKQM): helix and beta dominance.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637.g002>

### Evaluation of total IgG response to selected antigens

In the current study, the presence of total IgG antibody response from naturally *P. vivax*-infected individuals was assessed in face of the selected peptides (18 and 54 amino acids) and the whole *PvAMA-1* (560 amino acids) in order to compare the immunogenic capacity of each of them. For this purpose, samples from 121 individuals with acute infection by *P. vivax* were evaluated by conventional serology (ELISA). Regarding the frequency of individuals responding to the tested peptides and proteins, we observed a 57% positivity for *PvAMA-1* (69/121), 62% for the tripeptide (76/121) and 45.5% (55/121), 48.7% (59/121), 32.2% (39/121) for peptides I, II and III respectively. When compared to peptides I, II, III, the *PvAMA-1* (Fig 3A) presents a higher and statistically significant frequency only when compared to peptide III ( $p = <0.0002$  Fisher's exact test). Regarding peptides I and II, there is no significant difference between the frequency of responses, which suggests that those peptides alone can be recognized as much as the whole protein *PvAMA-1* (PI  $p = 0.09$ ; PII  $p = 0.24$ , Fisher's exact test). The same cannot be observed when we compare the frequency of response of the tripeptide (54aa) to the smaller ones. The tripeptide, which represents the chemical junction of peptides I, II and III, shows a higher frequency of positivity in all comparisons (PI  $p = 0.009$ ; PII  $p = 0.038$ ; PIII  $p = <0.0001$ , Fisher's exact test) (Fig 3B). Of relevance, although no significant differences were observed between the immunogenic capacity of *PvAMA-1* and the tripeptide ( $p = 0.43\%$ , Fisher's exact test), the frequency of respondents was different between these two



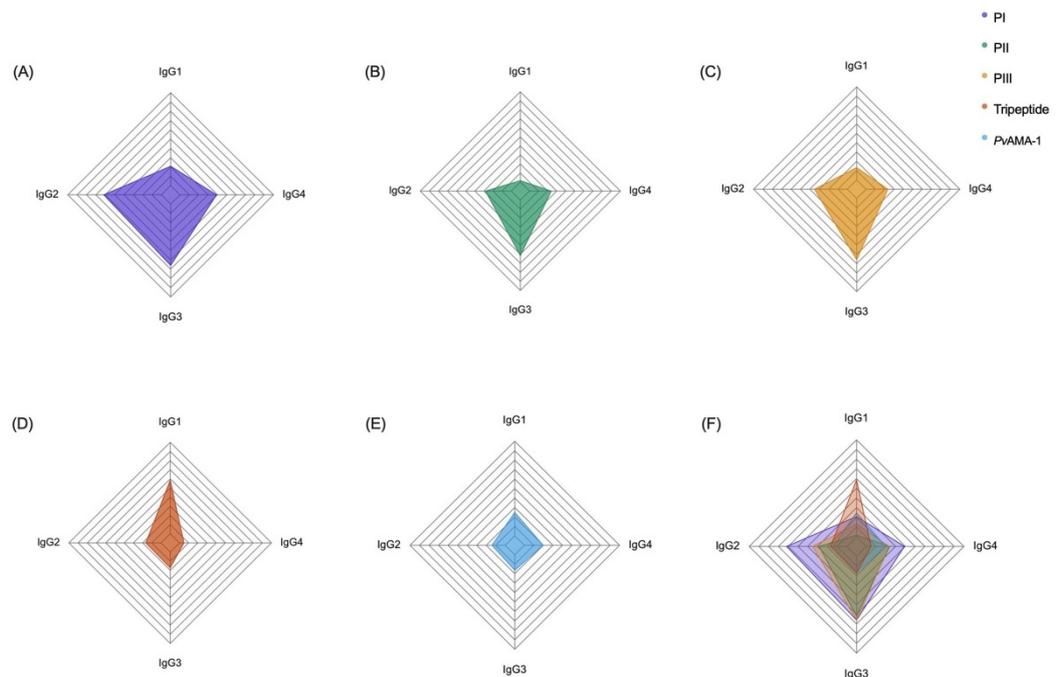
**Fig 3. Levels of specific IgG antibodies to PvAMA-1, Peptide I (PI), Peptide II (PII), Peptide III (PIII) and tripeptide.** (A) Comparison of the IgG levels between PvAMA-1 and the 18aa peptides. (B) Comparison of the IgG levels between tripeptide and the 18aa peptides. (C) Comparison between PvAMA-1 and tripeptide. The Y axis represents the mean reactivity index in naturally *P. vivax* infected individuals (= 121). The dotted line shows the positivity threshold (reactivity index = 1). The data were analyzed considering a 95% confidence interval (CI).  $P < 0.05$  was considered significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637.g003>

antigens (Fig 3C). More specifically, the percentage of individuals with specific antibodies to the tripeptide was slightly higher than against the whole protein (+ 5%).

### Similar IgG subclass response pattern between tested peptides

Although this type of data may considerably vary among individuals naturally infected with *Plasmodium vivax*, the level of specific antibodies for each IgG subclass followed a pattern as for peptides composed of only 18 amino acids (PI, PII, PIII). For them, there was a higher frequency of IgG2 (PI: 61.6% PII: 28.30% PIII: 35%) and IgG3 (PI: 66%; PII: 61.6%; PIII: 65.8%) (Fig 4A–4C). When compared to PvAMA-1, there was a statistically significant difference for the following subclasses: IgG 2 (PI  $p = <0.0001$ ; PII  $p = 0.01$ ; PIII  $p = 0.0003$ , Fisher's exact test); IgG 3 (PI, PII and PIII  $p = <0.0001$ , Fisher's exact test); IgG 4 (PI  $p = 0.001$ , Fisher's exact test). As for the tripeptide and PvAMA-1, subclass 1 had more frequent and robust recognition (Fig 4D and 4E).



**Fig 4. Proportion of IgG subclasses antibodies to the synthetic peptides and PvAMA-1.** (A) Peptide I; (B) Peptide II; (C) Peptide III; (D) Tripeptide; (E) PvAMA-1; (F) Peptides and Pv-AMA-1 merged together. The radar charts are divided into ten lines, each of them representing a 10% value. On each radar chart, data is shown as the frequency of individuals responding to an IgG subclass (n = 121). The data were analyzed considering a 95% confidence interval (CI).  $P < 0.05$  was considered significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637.g004>

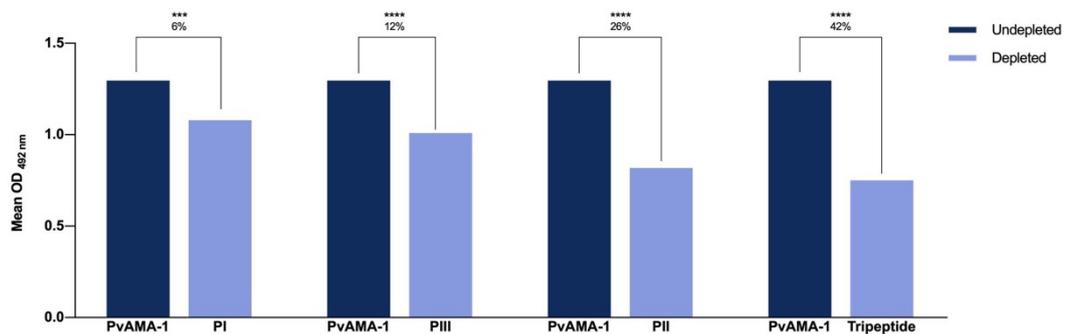
When compared, the frequencies showed by both antigens (*Pv-AMA-1* and tripeptide) have shown statistic similarity, except for subclass 1 (IgG 1) in which, for the tripeptide, we have 58.6% of recognition against 24.8% for *PvAMA-1* ( $p \leq 0.0001$ , Fisher's exact test). Overall, the *PvAMA-1* protein showed lower frequencies when compared to the four peptides, although in some cases the difference is not statistically significant (Fig 4F).

### Peptide immunodominance within total IgG antibody response

In order to determine the immunodominance of each peptide, a depletion ELISA assay was performed. In this assay, reactivity against *PvAMA-1* (IgG) was reduced substantially for all tested peptides (Fig 5). Respectively, the reduction was 6%, 12%, 26% and 42% for PI, PIII, PII and tripeptide peptides.

### Discussion

Although it has been available for a considerable time, *P. vivax* genome and proteome has been little explored in terms of identifying vaccine targets. Accordingly, the search using computational analysis is a major draw, since it has been shown to be highly effective in



**Fig 5. Immunodepletion showing specific antibody recognition to the synthetic peptides (PI, PII, PIII and tripeptide) in naturally *P. vivax*-infected individuals.** The sera were depleted with all four synthetic peptides and then evaluated for *PvAMA-1*. The Y-axis represents the mean antibody OD values ( $n = 121$ ). The data were analyzed considering a 95% confidence interval (CI).  $P < 0.05$  was considered significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258637.g005>

identifying targets within *Plasmodium* species, in addition to providing optimization of research time and vaccine production [32]. Here in, we evaluated the sero-immunological response of individuals from the Brazilian Amazon naturally infected by *P. vivax* against peptide targets identified within an important and essential protein: *PvAMA-1*. The individuals profile included in the study indicates that all of them are residents of an endemic area for malaria. Most individuals reported having been infected previously (86.8%) and the large variation between the number of previous episodes, as well as the predominance of males among those affected, is most likely due to different levels of exposure that may be related to the personal occupation of each individual.

The major goal was to assess the immunogenic capacity of selected targets using *in silico* techniques and to compare it with the response obtained from the main protein—*PvAMA-1*—which is currently one of the main vaccine targets for malaria vivax [33, 34]. Data from previous studies carried out with rodents and non-human primates have shown that *PvAMA-1* has already proved to be a promising target for inducing a protective immune response [10, 11, 35]. Several of them have confirmed its immunogenicity, especially in endemic areas such as the Brazilian Amazon [36–38]. In addition, the functionality of AMA-1-related antibodies has also been assessed. This protein was proved to be a key component in the invasion process through the moving junction (MJ) along with the RON complex, in which anti-AMA-1 antibodies were able to inhibit the binding interaction between them [10, 11, 35, 39, 40]. In our assessment, we found that the selected peptides can be as immunogenic as the protein from which they were extracted. While for *PvAMA-1* we have a total IgG response frequency of 57%, for subunits we found frequencies that varied between 32% - 62%, the largest of which came from the formulation containing the junction of the three peptides. In fact, with regard to *Pv-AMA1*, the response levels found corroborate with previous studies that evaluated the proteins immunogenic capacity [10, 41–43].

Among the disadvantages in peptide-based vaccine constructions, low immunogenicity is the most relevant. When compared to conventional vaccine formulations, such as those using inactivated or attenuated pathogens, the immune response generated can be considerably weaker [44, 45]. This is a relevant factor since a robust activation usually characterizes greater protection and longevity of the immune response, two very desirable vaccine features. However, stronger adjuvants may overcome this obstacle. A few peptide-based vaccines for wide-

impact diseases like leukemia [46], secondary progressive multiple sclerosis [47], and, more recently, SARS-Cov2 [48], have reached phase III studies this way. The latter has demonstrated efficacy of approximately 90% and is currently in the process of being approved for emergency use worldwide [49, 50]. Regarding to the tested targets, this does not appear to be an important limitation since the response obtained by three of the four peptides does not differ from the one induced by the entire protein. This data can be relevant when comparing the sizes of all antigenic targets (546aa, 54aa and 18aa for PvAMA-1, tripeptides and small peptides respectively) and considering the possibility of inserting the peptides in a chimeric construction containing multiple targets, which can generate an even more efficient response. Regarding to the response from the IgG subclasses, we found a similar pattern among small peptides with predominance of classes 2 and 3, highlighting the subclass 3. Individuals with high frequencies of IgG3 antibodies are known to have low parasitemia with clinical manifestations ranging from mild to moderate. For the tripeptide, a higher frequency of subclass 1 was observed. These data indicate that, in general, there is a dominant presence of cytophilic antibodies against peptide-based formulations among the tested individuals. It is well known that antibodies that belong to this class have the ability to activate effector cells of the immune system that can, therefore, play a protective role. Although it is not common, the relatively high frequency of IgG2 antibodies has also been observed in similar studies [51]. A study conducted in Ghana showed that the frequency of IgG2 antibodies in patients from malaria-endemic regions increased according to the individuals' age, indicating that this subclass may be involved in acquired immunity [52]. However, it is known that non-cytophilic antibodies, such as the case of this group (IgG2), when acting against the same epitope, can undermine the protective effect of the cytophilic ones [53]. Nevertheless, the effective role of each subclass of antibodies in mediating protection against peptide-based antigens remains to be clarified.

Finally, the depletion assays demonstrated that the individuals' antibodies can be quite specific against the studied antigens, with a recognition percentage of 6%, 12%, 26% and 42% for PI, PIII, PII and tripeptide respectively. In general, the results demonstrate that the peptides contain antigenic regions of extreme importance for the recognition of PvAMA-1, confirming its potential as possible targets for a chimeric composition of antigens. Of relevance, when tested against the serum of mice infected with *Plasmodium berghei*, the four peptides were 100% recognized (S3 Fig). The AMA-1 homology among the two species is around 50% [54] and, specifically amid the synthetic formulations, the amino acid overlapping can go from 33.4% up to 72.2% depending on the peptide. Whilst the common residues between the two of them may play a key role in antibody binding, further investigation on the matter, including an increase in the number of the *P. berghei*-infected subjects, is needed. Yet, this data is of considerable relevance since, in the future, a possible vaccine formulation will need to undergo studies in animal models and it is essential that there is homology in the recognition by the malaria species that are capable of infecting them.

## Conclusion

Based on in silico approaches for choosing potential targets, the present study exhibit three new peptide antigens with considerable immunogenic capacity when evaluated individually and quite expressive when under joint synthesis. The identification and initial assessment of these four linear B-cell epitopes represents an excellent perspective with regard to future chimeric vaccine constructions that may come to contemplate several targets with the potential to generate the robust and protective immune response that a vivax malaria vaccine needs to succeed.

## Supporting information

**S1 Fig. Amino acid variability of three PvAMA-1 isolates sequences, from PlasmoDB.** The X-axis corresponds to the amino acid position, while the Y-axis corresponds to the number of variants observed in each position. Variants were defined when an amino acid did not match to the most commonly observed in a given position.

(TIF)

**S2 Fig. Characterization of the synthetic peptides by MALDI-TOF-TOF.** The x-axis represents mass/load, while y-axis defines intensity (arbitrary unity). (A) Peptide I (EEFRDYENG EEKSNKQM). (B) Peptide II (SSGVRVDLGEDAEVENAK). (C) Peptide III (GDQRLKDGGF FPNADDH). (D) Tripeptide (SSGVRVDLGEDAEVENAKGDQKLDGGGFAPFNANDHEEFRDY YENGEKSNKQM).

(TIF)

**S3 Fig. Levels of specific total IgG antibodies in mice experimentally infected with *Plasmodium berghei* (n = 6).** Subjects with a Reactivity Index above 1 were considered positive. The R.I was calculated considering the mean OD of non-infected subjects (controls) +2SD (95% confidence interval).

(TIF)

**S1 Table. Presence of amino acids in each single position within PvAMA-1.** Rows corresponds to all amino acids belonging to PvAMA-1 (1–563) and columns represents a specific position within the protein (a–y). The numbers indicate how many times a given amino acid occurs at each position ranging from 0–64 times. Red boxes indicate regions corresponding to the peptides under study.

(XLSX)

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the State Laboratory of Pathology and Clinical (LEPAC) and the CEPEM Clinical Trial Research Team (Porto Velho, RO, Brazil) for field and laboratory assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Dhelio B. Pereira, Francisco P. Lobo, Daniela C. Bartholomeu, Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno.

**Data curation:** Raianna F. Fantin, Vanessa G. Fraga, Camila A. Lopes, Isabella C. de Azevedo, João L. Reis-Cunha, Francisco P. Lobo, Marcela M. de Oliveira, Anderson C. dos Santos, Daniela C. Bartholomeu, Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno.

**Formal analysis:** Raianna F. Fantin, Vanessa G. Fraga, Camila A. Lopes, João L. Reis-Cunha, Dhelio B. Pereira, Marcela M. de Oliveira, Anderson C. dos Santos, Daniela C. Bartholomeu, Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno.

**Funding acquisition:** Daniela C. Bartholomeu, Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno.

**Investigation:** Dhelio B. Pereira, Lilian L. Bueno.

**Methodology:** Raianna F. Fantin, Vanessa G. Fraga, Camila A. Lopes, Isabella C. de Azevedo, Dhelio B. Pereira, Marcela M. de Oliveira, Anderson C. dos Santos, Daniela C. Bartholomeu, Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno.

**Project administration:** Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno.

**Resources:** Isabella C. de Azevedo, Lilian L. Bueno.

**Software:** Francisco P. Lobo, Anderson C. dos Santos.

**Supervision:** Lilian L. Bueno.

**Validation:** Marcela M. de Oliveira, Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno.

**Writing – original draft:** Raianna F. Fantin, Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno.

**Writing – review & editing:** João L. Reis-Cunha.

## References

1. Global Malaria Programme. World Malaria Report 2020: 20 years of global progress & challenges. Geneva; 2020.
2. Pan American Health Organization (PAHO)/World Health Organization (WHO). Epidemiological Update: Malaria in the Americas in the context of COVID-19 pandemic. Washington D.C.; 2020.
3. Adams JH, Mueller I. The biology of plasmodium vivax. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2017; 7(9): 1–12.
4. White NJ, Imwong M. Relapse. *Advances in Parasitology*. 2012; 80: 113–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5> PMID: 23199487
5. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CHM, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends in Parasitology*. 2008; 24: 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.002> PMID: 18226584
6. Salgado-Mejias P, Alves FL, Françoiso KS, Riske KA, Silva ER, Miranda A, et al. Structure of Rhoptry Neck Protein 2 is essential for the interaction in vitro with Apical Membrane Antigen 1 in *Plasmodium vivax*. *Malaria Journal*. 2019; 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2649-6> PMID: 30683104
7. França ACB, Françoiso KS, Marques RF, Trossini GHG, Gomes RA, Póvoa MM, et al. Antibodies Against the *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 From the Belem Strain Share Common Epitopes Among Other Worldwide Variants. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11:616230. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.616230> PMID: 33796476
8. Bargieri DY, Andenmatten N, Lagal V, Thiberge S, Whitelaw JA, Tardieux I, et al. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nature Communications*. 2013; 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3552> PMID: 24108241
9. Triglia et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Molecular microbiology [Internet]*. 2000; 38(4):706–18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02175.x> PMID: 11115107
10. Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourão LC, de Ávila RAM, Soares IS, et al. Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). *PLoS ONE*. 2011; 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021289> PMID: 21713006
11. Seth RK, Bhat AA, Rao DN, Biswas S. Acquired immune response to defined *Plasmodium vivax* antigens in individuals residing in northern India. *Microbes and Infection [Internet]*. 2010; 12(3):199–206. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.006> PMID: 20034587
12. Rodrigues-Da-silva RN, da Silva JHM, Singh B, Jiang J, Meyer EVS, Santos F, et al. In silico identification and validation of a linear and naturally immunogenic B-cell epitope of the *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidate merozoite surface protein-9. *PLoS ONE*. 2016; 11(1):1–18.
13. George MT, Schloegel JL, Ntumngia FB, Barnes SJ, King CL, Casey JL, et al. Identification of an Immunogenic Broadly Inhibitory Surface Epitope of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Ligand Domain. *mSphere*. 2019; 4(3):1–14. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00194-19> PMID: 31092602
14. Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical Science*. 2016; 7(2):842–54. <https://doi.org/10.1039/c5sc03892h> PMID: 28791117
15. Malonis RJ, Lai JR, Vergnolle O. Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. *Chemical Reviews*. 2020; 120(6):3210–29. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00472> PMID: 31804810
16. Oyibo FO, Audu SI, Ajibade YE, Ahmed TA. Factors Influencing Malaria Incidence among Rural Farming Households: Evidence from Kogi Agricultural Zones. *Asian Journal of Research in Infectious Diseases*. 2020; 9:1–9.

17. Lana R, Nekkab N, Siqueira AM, Peterka C, Marchesini P, Lacerda M, et al. The top 1%: quantifying the unequal distribution of malaria in Brazil. *Malaria Journal*. 2021; 20(1).
18. Degarege A, Fennie K, Degarege D, Chennupati S, Madhivanan P. Improving socioeconomic status may reduce the burden of malaria in sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2019; 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211205> PMID: 30677102
19. Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, et al. PlasmoDB: A functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Research*. 2009;37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn814> PMID: 18957442
20. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013; 30(4):772–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010> PMID: 23329690
21. Shen W, Le S, Li Y, Hu F. SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PLoS ONE*. 2016; 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962> PMID: 27706213
22. Charif D, Lobry JR. SeqinR 1.0–2: A Contributed Package to the R Project for Statistical Computing Devoted to Biological Sequences Retrieval and Analysis [Internet]. Available from: <http://www.R-project.org/>.
23. Hadley Wickham. ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis [Internet]. 2nd ed. Available from: <http://www.springer.com/series/6991>.
24. Dhom-Lemos L, Viana AG, Cunha JLR, Cardoso MS, Mendes TAO, Pinheiro GRG, et al. Leishmania infantum recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*. 2019; 14(1):1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211719> PMID: 30703138
25. Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR, Cômido AN, Rodrigues MM, Kocken CHM, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. *International Journal for Parasitology*. 2005; 35(2):185–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.11.003> PMID: 15710439
26. Santiago HC, Bennuru S, Boyd A, Eberhard M, Nutman TB. Structural and immunologic crossreactivity among filarial and mite tropomyosin: implications for the hygiene hypothesis. 2012; 127(2):479–86.
27. Ma J, Wang S, Zhao F, Xu J. Protein threading using context-specific alignment potential. *Bioinformatics*. 2013;29(13). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt210> PMID: 23812991
28. Xu J. Distance-based protein folding powered by deep learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019; 116(34):16856–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821309116> PMID: 31399549
29. Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*. 2012; 7(8):1511–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085> PMID: 22814390
30. Ma J, Peng J, Wang S, Xu J. A conditional neural fields model for protein threading. *Bioinformatics*. 2012;28(12). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-28> PMID: 22321652
31. Peng J, Xu J. A multiple-template approach to protein threading. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2011; 79(6):1930–9. <https://doi.org/10.1002/prot.23016> PMID: 21465564
32. Rappuoli R, Bottomley MJ, D'Oro U, Finco O, de Gregorio E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *Journal of Experimental Medicine*. 2016; 213(4):469–81. <https://doi.org/10.1084/jem.20151960> PMID: 27022144
33. Chaurio RA, Pacheco MA, Cornejo OE, Durrego E, Stanley CE, Castillo AI, et al. Evolution of the Transmission-Blocking Vaccine Candidates Pvs28 and Pvs25 in Plasmodium vivax: Geographic Differentiation and Evidence of Positive Selection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016; 10(6):1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004786> PMID: 27347876
34. Mueller I, Shakri AR, Chitnis CE. Development of vaccines for Plasmodium vivax malaria. *Vaccine*. 2015; 33(52):7489–95. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.060> PMID: 26428453
35. Wickramarachchi T, Premaratne PH, Perera KLRL, Bandara S, Kocken CHM, Thomas AW, et al. Natural Human Antibody Responses to Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 under Low Transmission and Unstable Malaria Conditions in Sri Lanka. *Society*. 2006; 74(1):798–801. <https://doi.org/10.1128/AI.74.1.798-801.2006> PMID: 16369044
36. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Costa HL, Torres LM, et al. Blood-stage Plasmodium vivax antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS ONE*. 2018; 13(11): e0207244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207244> PMID: 30419071
37. Vicentin EC, Franoso KS, Rocha M v., Iourtov D, dos Santos FL, Kubrusly FS, et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 expressed in

- Pichia pastoris* yeast. *Infection and Immunity*. 2014; 82(3):1296–307. <https://doi.org/10.1128/IAI.01169-13> PMID: 24379279
38. Soares RR, Nakaie CR, Rodrigues-da-Silva RN, da Silva RL, Lima-Junior J da C, Scopel KKG. Main B-cell epitopes of PvAMA-1 and PvMSP-9 are targeted by naturally acquired antibodies and epitope-specific memory cells in acute and convalescent phases of vivax malaria. *Parasite Immunology*. 2020;1; 42(5). <https://doi.org/10.1111/pim.12705> PMID: 32096238
  39. Normand BV le Saul FA, Hoos S, Faber BW, Bentley GA. Cross-reactivity between apical membrane antigen 1 and rhostry neck protein 2 in *P. vivax* and *P. falciparum*: A structural and binding study. *PLoS ONE*. 2017;1; 12(8).
  40. Bermúdez M, Arévalo-Pinzón G, Rubio L, Chaloin O, Muller S, Curtidor H, et al. Receptor–ligand and parasite protein–protein interactions in *Plasmodium vivax*: Analysing rhostry neck proteins 2 and 4. *Cellular Microbiology*. 2018;1; 20(7). <https://doi.org/10.1111/cmi.12835> PMID: 29488316
  41. Salavatifar M, Zakeri S, Mehrizi AA, Mirkhazemi S, Djadid ND. Evaluation of Naturally Acquired Antibody Responses to Two Variant Forms of *Plasmodium vivax* Apical Membrane. *Archives of Iranian medicine*. 2015; 18:35–8. <https://doi.org/10.151812/AIIM.008> PMID: 26621016
  42. Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: Persistence and correlation with malaria transmission intensity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006; 75(4):582–7. PMID: 17038677
  43. Rocha MV, Françoço KS, Lima LC, Camargo TM, Machado RLD, Costa FTM, et al. Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP119. *Vaccine*. 2017; 35(18):2463–72. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.023> PMID: 28341111
  44. Lei Y, Zhao F, Shao J, Li Y, Li S, Chang H, et al. Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines. *PeerJ*. 2019; 2019(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.6185> PMID: 30656066
  45. Azmi F, Fuaad AAHA, Skwarczynski M, Toth I. Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines. Vol. 10, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Landes Bioscience. 2014;778–96. <https://doi.org/10.4161/hv.27332> PMID: 24300669
  46. Qazilbash MH, Wieder E, Thall PF, Wang X, Rios R, Lu S, et al. PR1 peptide vaccine induces specific immunity with clinical responses in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2017; 31(3):697–704. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.254> PMID: 27654852
  47. Vandenbark AA, Culbertson NE, Bartholomew RM, Huan J, Agotsch M, LaTocha D, et al. Therapeutic vaccination with a trivalent T-cell receptor (TCR) peptide vaccine restores deficient FoxP3 expression and TCR recognition in subjects with multiple sclerosis. *Immunology*. 2008; 123(1):66–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02703.x> PMID: 17944900
  48. Abdujaleel Z, Al-Allaf FA, Aziz SA. Peptides-based vaccine against SARS-nCoV-2 antigenic fragmented synthetic epitopes recognized by T cell and  $\beta$ -cell initiation of specific antibodies to fight the infection. *Bio-Design and Manufacturing*. 2021; 4(3):490–505. <https://doi.org/10.1007/s42242-020-00114-3> PMID: 33552630
  49. Lei Y, Zhao F, Shao J, Li Y, Li S, Chang H, et al. Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines. *PeerJ*. 2019; 2019(1):1–48. <https://doi.org/10.7717/peerj.6185> PMID: 30656066
  50. Azmi F, Fuaad AAHA, Skwarczynski M, Toth I. Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2014; 10(3):778–96. <https://doi.org/10.4161/hv.27332> PMID: 24300669
  51. Matos A da S, Rodrigues-da-Silva RN, Soares IF, Baptista B de O, Souza RM de, Bitencourt-Chaves L, et al. Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals From the Brazilian Amazon. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10:1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00001> PMID: 30723466
  52. Doodoo D, Aikins A, Kusi KA, Lamptey H, Remarque E, Milligan P, et al. Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP1 19, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malaria Journal*. 2008; 7:1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-1> PMID: 18173836
  53. Afridi S, Atkinson A, Garnier S, Fumoux F, Rihet P. Malaria resistance genes are associated with the levels of IgG subclasses directed against *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in Burkina Faso. *Malaria Journal*. 2012; 11:1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-308> PMID: 22947458
  54. Madden Tom. The BLAST Sequence Analysis Tool. In: McEntyre J, Ostell J, editors. *The NCBI Handbook*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information; 2021.

## 6.2 Proteomic analysis of urine from patients with *Plasmodium vivax* malaria unravels a unique *P. vivax* protein that is absent from *P. falciparum*



Communication

### Proteomic Analysis of Urine from Patients with *Plasmodium vivax* Malaria Unravels a Unique *Plasmodium vivax* Protein That Is Absent from *Plasmodium falciparum*

Raianna F. Fantin <sup>1,†</sup> , Claudia Abeijon <sup>2,†</sup>, Dhelio B. Pereira <sup>3</sup> , Ricardo T. Fujiwara <sup>1</sup> , Lilian L. Bueno <sup>1,\*</sup> and Antonio Campos-Neto <sup>2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

<sup>2</sup> DetectoGen Inc., Westborough, MA 01581, USA

<sup>3</sup> Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM), Porto Velho 76812-329, RO, Brazil

<sup>4</sup> Department of Infectious Disease and Global Health, Cummings School of Veterinary Medicine, Tufts University, North Grafton, MA 01536, USA

\* Correspondence: llbueno@idb.ufmg.br (L.L.B.); acampos@detectogen.com or antonio.campos@tufts.edu (A.C.-N.)

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Five species of *Plasmodium* cause malaria in humans and two of them, *P. vivax* and *P. falciparum*, pose the greatest threat. Rapid antigen detection tests (RADT) have been used for many years to diagnose and distinguish malaria caused by these two parasites. *P. falciparum* malaria can single-handedly be diagnosed using an RADT, which detects the unique *P. falciparum* specific histidine-rich protein 2 (HRP2). Unfortunately, there is no RADT that can single-handedly diagnose *P. vivax* malaria because no specific marker of this parasite has yet been described. Here, we report the discovery of a unique *P. vivax* protein (Vir14, NCBI Reference Sequence: XP\_001612449.1) that has no sequence similarity with proteins of *P. falciparum* and no significant similarities with proteins of other species of *Plasmodium*. We propose that this protein could be an outstanding candidate molecule for the development of a promising RADT that can single-handedly and specifically diagnose *P. vivax* malaria.

**Keywords:** rapid antigen detection test; malaria; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*; Vir14



**Citation:** Fantin, R.F.; Abeijon, C.; Pereira, D.B.; Fujiwara, R.T.; Bueno, L.L.; Campos-Neto, A. Proteomic Analysis of Urine from Patients with *Plasmodium vivax* Malaria Unravels a Unique *Plasmodium vivax* Protein That Is Absent from *Plasmodium falciparum*. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 314. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7100314>

Academic Editor: Hans-Peter Fuehrer

Received: 24 September 2022

Accepted: 12 October 2022

Published: 18 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### 1. Introduction

The World Health Organization (WHO) projected that the worldwide incidence of malaria in 2020 was 241 million cases and 627,000 deaths (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>, accessed on 26 July 2022). Five species of *Plasmodium* cause malaria in humans, namely *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi*. Two of them, *P. vivax* and *P. falciparum*, pose the greatest threat to humans [1]. The reference standard diagnosis of malaria is the microscopic observation of the parasites in stained blood smears [2]. PCR tests are relatively more sensitive and precise than microscopy [3,4]. However, nucleic acid-based tests remain complicated and expensive for routine use in malaria endemic areas. Conventional serological tests are of limited value because, in endemic areas, most people have antibody titers from previous malaria infections [5]. Rapid antigen detection tests (RADT) have been used for many years [6] and the WHO recommends that all cases of suspected malaria be confirmed by either gold standard microscopy or RADT before the administration of treatment ([https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/clinicians1.html](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/clinicians1.html), accessed on 30 September 2022).

The currently available RADTs primarily use two *Plasmodium* antigens [6–8]. One is the *P. falciparum* specific histidine-rich protein 2 (HRP2) and the second is the pan-malarial antigen lactate dehydrogenase (LDH). *Plasmodium* aldolase, which is also a pan-malarial

antigen, has been used in some RADTs [9]. HRP2-based RADT is used to diagnose *P. falciparum* malaria single-handedly and specifically.

These RADTs have unquestionably facilitated the diagnosis of malaria, however the tests have limitations, such as: 1. variability in their sensitivity/specificity; 2. of the three markers used in the tests, only HRP2 is a species-specific marker (*P. falciparum*); and 3. there is no specific RADT for *P. vivax* malaria because no specific marker of this parasite has been described.

We have recently used mass spectroscopy to successfully identify *Plasmodium* protein biomarker candidates that are excreted in the urine of malaria patients. One of the identified proteins (variable surface protein Vir14, NCBI Reference Sequence: XP\_001612449.1) is of great interest in that it is highly unique to *P. vivax*, with no significant similarity with any protein of *P. falciparum*. Vir14 also lacks homology with proteins of *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi*, as well as with any human proteins.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Clinical Specimens

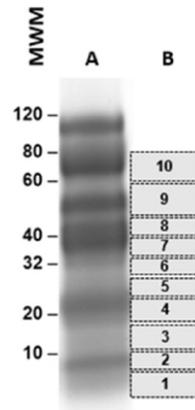
Four stored frozen and de-identified urine samples and 121 serum samples were from *P. vivax* malaria patients from the Amazon area in Brazil were obtained. The patients were from the Research Center for Tropical Medicine (CEPEM), Porto Velho, RO. Approval to use these samples was obtained from the Human Research Ethics Committee—COEP (CAAE-00842112.2.0000.5149).

### 2.2. Mass Spectroscopy Analysis

Individual urine samples (3–4 mL) were concentrated using Centricon P3 (3 kDa cutoff filters) to ~200–300 µL. Equal volumes of concentrated urine samples were mixed with an electrophoresis sample buffer and then submitted to SDS-PAGE, followed by Coomassie staining. Bands ranging from ~5 kDa to ~75 kDa were excised from the gel (Figure 1) and submitted for mass spectroscopy (MS) analysis at the Taplin Mass Spectrometry Facility, Harvard Medical School, Boston, MA. For each urine sample, eight to ten bands were cut from the gel. Each band was then independently submitted to MS runs. Gel bands were trypsin-digested into peptides. Peptides were analyzed by nano-scale liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer. Eluted peptides first had their molecular masses measured and were then fragmented before the fragment masses were measured. The specific fragmentation pattern was computer-searched against predicted tryptic peptides from all known proteins from genome sequencing projects of humans and *Plasmodium* parasites. The power of this technique is in its redundancy. As many peptides are generated from the initial gel band, multiple matches to the protein of interest were detected. In this way, the protein identity is completely unambiguous. Peptide score cutoff values were chosen at Xcorr of >1.8 for singly charged ions, 2.5 for double charged ions, and 3.0 for triple charged ions, along with deltaCN values of 0.1, and RSP values of 1. The cross-correlation values chosen for each peptide assured a high confidence match for the different charge states, while the deltaCN cutoff ensured the uniqueness of the peptide hit. The RSP value of 1 ensured that the peptide matched the top hit in the preliminary scoring and that the peptide fragment file only matched one protein hit.

### 2.3. Recombinant Protein and ELISA

Expression and purification of recombinant Vir14 protein and direct ELISA were performed, as previously published [10–12].



**Figure 1.** Illustration of gel bands that were cut from PAGE for subsequent mass spectroscopy analysis. The patient urine samples (3 mL) had a concentration of ~300  $\mu$ L and were subjected to PAGE, followed by Coomassie blue staining (A). Ten bands were cut from the gel (B) and subjected to mass spectroscopy for the identification of *P. vivax* peptide sequences.

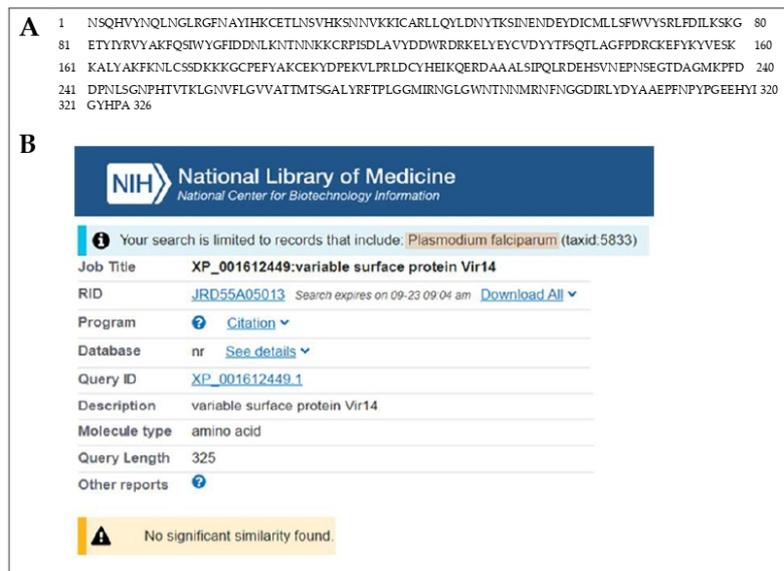
### 3. Results

#### 3.1. Discovery and Characterization of a Unique *P. vivax* Protein Present in the Urine of Patients with *P. vivax* Malaria from Brazil

For the malarial antigen discovery strategy, we used the same protocol that we previously and successfully employed for the identification of *Leishmania infantum*/*Leishmania donovani* proteins in the urine of visceral leishmaniasis (VL) patients [10–14]. For the current study, we used urine samples from malaria patients from the Amazon area in Brazil. The patients were from the Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM), Porto Velho, RO. The samples were collected before the initiation of therapy and were from patients diagnosed with malaria, based on the following criteria: (a) a clinical course consistent with malaria, including a fever, chills, headaches, muscular aching and weakness, vomiting, coughing, diarrhea and abdominal pain; and (b) laboratory findings that confirm the presence of *P. vivax* by both thick Giemsa stain blood smear microscopy and PCR [15–17]. Parasitemia levels were 500–10,000/ $\mu$ L of blood. None of the patients had any clinical symptoms or laboratory findings compatible with renal or urinary tract abnormalities, and none of them were receiving anti malaria therapy at the time of urine collection. Urine samples were collected from four *P. vivax* malaria patients. Urine was concentrated using Centricon <3 kDa and submitted to PAGE Coomassie blue stain. Bands were excised from the gels and submitted for mass spectroscopy analysis (MS), which revealed that all four urine samples contained at least one putative *P. vivax* protein (Table 1). These proteins were unambiguously identified because the criteria used in the MS to define the significance of a peptide “hit” were above the expected rankings, i.e., XCorr >2.0 and DelCn >0.1 [18,19]. Among the five identified putative *P. vivax* proteins listed in Table 1, the approach revealed the *P. vivax* variable surface protein Vir14 (highlighted in green, NCBI Reference Sequence: XP\_001612449.1), which was present in the urine of two of the four *P. vivax* patients analyzed (band #8, Figure 1). The BLAST analysis of Vir14 revealed no significant similarity with any protein of *P. falciparum*, even when this organism was specifically included in the search (Figure 2). The other four identified proteins were interpreted to be of lesser interest for future RADT development specific for *P. vivax* malaria because they had significant similarities with proteins of *P. falciparum*. Consequently, these observations confirmed that Vir14 is a unique candidate molecule for the development of an RADT highly specific for *P. vivax*.

**Table 1.** *Plasmodium vivax* peptides identified by mass spectroscopy in urine samples of patients with *P. vivax* malaria from Brazil.

Peptide Identified in Patient Urines	XCorr	ΔCorr	<i>P. vivax</i> Donor Protein	MW (Da)	Identity with <i>P. falciparum</i> Protein	Accession Numbers <i>P. vivax</i> (Pv) <i>P. falciparum</i> (Pf)
KMNLDEFNELVEQRNR	2.48	0.125	Proteasome regulatory subunit p27	33,710.41	>75%	XP_001614534.1 Pv XP_001351248.1 Pf
TINEGQTLTVEFK YQFINIER	3.46 1.88	0.623 0.160	Profilin	19,287.32	>95%	XP_001608363.1 Pv XP_001352188.1 Pf
GVDMHNEEIKAVIK	2.46	0.205	Uncharacterized protein	44,559.84	50%	XP_001614264.1 Pv XP_001350199.1 Pf
DAAALSIPQLR	2.51	0.248	Variable surface protein Vir14	37,719.38	None	XP_001612449.1 Pv
EELNKINYNPR	2.63	0.351	Heat shock protein, class I	26,949.43	>58%	XP_001616584.1 Pv XP_001350519.1 Pf

**Figure 2.** Amino acid sequence and NCBI BLAST analysis (protein/protein) of *P. vivax* Vir14 (XP\_001612449.1). The BLAST analysis of the full-length protein sequence (A) revealed that the Vir14 protein is unique to *P. vivax* and that it has no significant similarity with any proteins of *P. falciparum* proteins (B), proteins of other *Plasmodium* species (not shown) or with human proteins (not shown).

### 3.2. Recognition of Vir14 by Sera from Patients with *P. vivax* Malaria

To begin the validation of Vir14 as a *P. vivax* marker produced in vivo during infection, we initially investigated the presence of anti-Vir14 specific antibodies in the sera of malaria patients (Table 2). It is important to emphasize that this approach did not aim to evaluate the usefulness of Vir14 as a target antigen for the serological diagnosis of *P. vivax* malaria. The aim was to indirectly confirm that Vir14 is indeed an antigen that is produced by the parasite during the disease, thus an antigen that is suitable as target for the development of an antigen detection test. Sera were collected from *P. vivax*-infected subjects ( $n = 121$ ) and from healthy control subjects ( $n = 6$ ) from Brazil. This was assessed in relation to the antibody recognition of Vir14. This assessment was carried out by direct antibody ELISA

using purified recombinant Vir14 as antigen and sera diluted at 1/50. We found that 61% of patients presented circulating antibodies against Vir14. These findings strongly suggest that Vir14 is a *P. vivax* protein that is actively produced in vivo during the disease.

**Table 2.** Detection of anti-Vir14 specific antibodies in the sera of *P. vivax* malaria patients.

	Normal Healthy Control Subjects (6)	<i>P. vivax</i> Malaria Patients (n = 121)
Positive sera (% of patients) *	0	61

(\*) Sera were diluted at 1/50 based on previous titration using sera from normal healthy control subjects. The cutoff OD to consider a serum from *P. vivax* malaria patient positive was calculated as the mean of the OD obtained for the sera from the normal healthy control subjects plus 3 standard deviations of that mean.

#### 4. Discussion

*P. falciparum* malaria can single-handedly be diagnosed using an RADT that detects the unique *P. falciparum* specific histidine-rich protein 2 (HRP2). Unfortunately, there is currently no RADT that can single-handedly be used for the of *P. vivax* malaria. To diagnose this type of malaria, the existing RADTs are formatted to detect both the pan-malarial lactate dehydrogenase (LDH) antigen as well the *P. falciparum* specific HRP2 molecule in order to exclude the possibility of *P. falciparum* malaria. A positive result for both HRP2 and LDH assures the diagnosis of *P. falciparum* malaria. A negative HRP2 result and a positive LDH excludes the diagnosis of *P. falciparum* malaria, but does not specify which other malaria is being diagnosed because LDH is a ubiquitous pan-malarial antigen. This limitation unquestionably creates a diagnostic complication that unfortunately occurs in areas of the world (e.g., South America) where malaria is caused by *P. vivax* and by other *Plasmodium* species, including *P. falciparum*. In these co-endemic malarial areas, this diagnostic distinction is imperative because of the need to separate the treatment approach for *P. falciparum* and *P. vivax* [20–23]. Further, the CDC guidelines to treat malaria emphasizes that determination of the infecting *Plasmodium* species for treatment purposes is critical for four main reasons: first, *P. falciparum* can cause rapidly progressive severe illness or death, while *P. vivax* is less likely to cause severe disease. Second, *P. vivax* infections also require treatment for the hypnozoites, which remain dormant in the liver and can cause relapsing episodes. Third, *P. falciparum* and *P. vivax* species have different drug resistance patterns in different geographic regions of the world. Finally, for *P. falciparum*, the urgent initiation of appropriate therapy is especially critical ([https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/clinicians1.html](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/clinicians1.html), accessed on 30 September 2022). Therefore, an RADT that can specifically and single-handedly diagnose *P. vivax* malaria will be of great significance [24].

We have previously described an interesting alternative approach for the direct identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania* antigens in urine samples of patients with tuberculosis and visceral leishmaniasis [10–12,25–27]. We performed mass spectroscopy (MS) analysis in urine samples instead of blood because urine has far less host proteins than blood, thus enormously diminishing the background results generated by the MS. In addition, the rationale of using urine as a source of the pathogen's antigens was based on the premise that microbial proteins or their breakdown products (peptides) produced in vivo, e.g., in organs like liver, lung, bone marrow, blood, etc., will have to be eliminated from the body, which will be physiologically and most likely be excretion in the urine. The translation of our original strategy of antigen discovery to patients with *P. vivax* malaria was readily achieved. Using this approach, we were able to discover a unique protein from this parasite that could be of outstanding interest for the development of an RADT that can single-handedly and specifically diagnose *P. vivax* malaria.

The discovered protein, variable surface protein Vir14, which is putative (Vir14) from *P. vivax*, has no significant similarity with any protein of *P. falciparum*. In addition, the protein has little similarity with proteins of *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi*. NCBI protein-protein BLAST of *P. vivax* Vir14 using databases (taxid) of these *Plasmodium* shows similarities of only 27%, 36% and 20% with proteins of these parasites, respectively. No sig-

nificant similarity exists between Vir14 and human proteins. Moreover, using conventional ELISA, we have found that 61% of patients with *P. vivax* malaria have anti-Vir14 antibodies. Finally, Vir14 is produced by *P. vivax* merozoites and is exported from the cytoplasm of the parasites to the membrane of infected red blood cells [28].

While Vir14 expresses some areas of amino acid sequence variability among variants of *P. vivax*, it nonetheless has extensive areas of conserved sequences in over 100 sequences of this *Plasmodium* species, as revealed by the NCBI BLAST analysis. It is important to emphasize that these are species-conserved sequences, i.e., they are unique to *P. vivax*, and are only minorly present in other species of *Plasmodium* and absent in *P. falciparum*. Therefore, a highly sensitivity and specific *P. vivax* RADT can be successfully developed using monoclonal antibodies specific for the conserved sequences of Vir14.

The fact that Vir14 was initially found by MS in two out of the four urine samples from *P. vivax* malaria, means, in our view, that this small sample size should not be considered not significant for the translation of this finding to a *P. vivax* specific RADT. What is relevant was the serendipitous unraveling of the undisputed fact that *P. vivax* produces a protein that is unique to this species of *Plasmodium* and that this protein is completely absent in *P. falciparum*. It is also important to mention the fact that Vir14 is a protein that is produced by all *P. vivax* thus far sequenced (NCIB BLAST analysis not shown). Therefore, an antigen detection test that uses blood samples should be successful, because, by definition, the parasite (and Vir14) is present in 100% of patients with the disease.

In conclusion, we have unraveled a unique protein of *P. vivax* that has an enormous potential for the development of an RADT that can single-handedly diagnose *P. vivax* malaria. This suggestion is supported by the following premises: 1. Vir14 was found in bodily fluids of patients with *P. vivax* malaria; 2. Vir14 is a unique protein of *P. vivax* that is absent in *P. falciparum* and other *Plasmodium* species; 3. Vir14 is produced by *P. vivax* merozoites and has been detected in the membrane of infected human red blood cells; and 4. The Vir14 protein is actively produced in vivo during disease, as patients with *P. vivax* malaria have anti-Vir14 antibodies in their blood. Nonetheless, it is important to keep in mind that, for most RADTs, the concentration of the marker in the patient's sample is a critical condition for the success of this diagnostic strategy. Presently, there is no information about the concentration of Vir14 in the blood of patients with *P. vivax* malaria.

Finally, in collaboration with the company Safetest, Belo Horizonte, MG, Brazil, we are currently working on the development of a Vir14-based RADT for the diagnosis of *P. vivax* malaria.

**Author Contributions:** C.A., R.F.F. and L.L.B. performed the experiments. A.C.-N. conceptualize the experiments. R.F.F., C.A., L.L.B., R.T.F. and A.C.-N. performed the analyses. D.B.P. selected patients and provided reagents. A.C.-N. wrote the first draft and all other authors revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG, Brazil (Grant# CBB APQ-00766-18), the Brazilian National Research Council (CNPq) (Grant# 421392/2018-5 and Grant# 302491/2017-1), RTF and LLB are Research Fellows from the Brazilian National Research Council (CNPq).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Research Ethics Council of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CAAE 27466214.0.0000.5149).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study and research meets the criteria for Exemption 4 because all human samples used in the project already existed, were de-identified, and were not collected specifically for this project.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

**Conflicts of Interest:** C.A. was an employee of DetectoGen Inc., and has an ownership option in the company. A.C.-N. is a co-founder/director of DetectoGen Inc. and has ownership of the company. None of the other co-authors has any financial conflict of interest.

## References

- Phillips, M.A.; Burrows, J.N.; Manyando, C.; van Huijsduijnen, R.H.; Van Voorhis, W.C.; Wells, T.N.C. Malaria. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Payne, D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull. World Health Organ.* **1988**, *66*, 621–626. [[PubMed](#)]
- Johnston, S.P.; Pieniazek, N.J.; Xayavong, M.V.; Slemenda, S.B.; Wilkins, P.P.; da Silva, A.J. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 1087–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lucchi, N.W.; Gaye, M.; Diallo, M.A.; Goldman, I.F.; Ljolje, D.; Deme, A.B.; Badiane, A.; Ndiaye, Y.D.; Barnwell, J.W.; Udhayakumar, V.; et al. Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Voller, A.; Draper, C.C. Immunodiagnosis and sero-epidemiology of malaria. *Br. Med. Bull.* **1982**, *38*, 173–177. [[CrossRef](#)]
- Chiodini, P.L. Malaria diagnostics: Now and the future. *Parasitology* **2014**, *141*, 1873–1879. [[CrossRef](#)]
- Jang, I.K.; Tyler, A.; Lyman, C.; Kahn, M.; Kalnoky, M.; Rek, J.C.; Arinaitwe, E.; Adrama, H.; Murphy, M.; Imwong, M.; et al. Simultaneous Quantification of *Plasmodium* Antigens and Host Factor C-Reactive Protein in Asymptomatic Individuals with Confirmed Malaria by Use of a Novel Multiplex Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00948-18. [[CrossRef](#)]
- Mathison, B.A.; Pritt, B.S. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2009–2017. [[CrossRef](#)]
- Barber, B.E.; William, T.; Grigg, M.J.; Piera, K.; Yeo, T.W.; Anstey, N.M. Evaluation of the sensitivity of a pLDH-based and an aldolase-based rapid diagnostic test for diagnosis of uncomplicated and severe malaria caused by PCR-confirmed *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum*, and *Plasmodium vivax*. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 1118–1123. [[CrossRef](#)]
- Abeijon, C.; Alves, F.; Monnerat, S.; Mbui, J.; Viana, A.G.; Almeida, R.M.; Bueno, L.L.; Fujiwara, R.T.; Campos-Neto, A. Urine-based antigen detection assay for diagnosis of visceral leishmaniasis using monoclonal antibodies specific for six protein biomarkers of *Leishmania infantum*/*Leishmania donovani*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008246. [[CrossRef](#)]
- Abeijon, C.; Alves, F.; Monnerat, S.; Wasunna, M.; Mbui, J.; Viana, A.G.; Bueno, L.L.; Siqueira, W.F.; Carvalho, S.G.; Agrawal, N.; et al. Development of a multiplexed assay for the detection of *Leishmania donovani*/*Leishmania infantum* protein biomarkers in the urine of patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e02076-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Abeijon, C.; Kashino, S.S.; Silva, F.O.; Costa, D.L.; Fujiwara, R.T.; Costa, C.H.; Campos-Neto, A. Identification and diagnostic utility of *Leishmania infantum* proteins found in urine samples from patients with visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* **2012**, *19*, 935–943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Abeijon, C.; Campos-Neto, A. Potential non-invasive urine-based antigen (protein) detection assay to diagnose active visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2161. [[CrossRef](#)]
- Abeijon, C.; Singh, O.P.; Chakravarty, J.; Sundar, S.; Campos-Neto, A. Novel Antigen Detection Assay to Monitor Therapeutic Efficacy of Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 800–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Snounou, G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol. Biol.* **1996**, *50*, 263–291.
- Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Jarra, W.; Thaithong, S.; Brown, K.N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *58*, 283–292. [[CrossRef](#)]
- Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Zhu, X.P.; Jarra, W.; Pinheiro, L.; do Rosario, V.E.; Thaithong, S.; Brown, K.N. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *61*, 315–320. [[CrossRef](#)]
- Anderson, D.C.; Li, W.; Payan, D.G.; Noble, W.S. A new algorithm for the evaluation of shotgun peptide sequencing in proteomics: Support vector machine classification of peptide MS/MS spectra and SEQUEST scores. *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 137–146. [[CrossRef](#)]
- Xu, T.; Park, S.K.; Venable, J.D.; Wohlschlegel, J.A.; Diedrich, J.K.; Cociorva, D.; Lu, B.; Liao, L.; Hewel, J.; Han, X.; et al. ProLuCID: An improved SEQUEST-like algorithm with enhanced sensitivity and specificity. *J. Proteom.* **2015**, *129*, 16–24. [[CrossRef](#)]
- Baird, J.K.; Valecha, N.; Duparc, S.; White, N.J.; Price, R.N. Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 35–51. [[CrossRef](#)]
- Bassat, Q. The importance of being vivax. *J. Trop. Pediatr.* **2014**, *60*, 335–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Price, R.N.; Commons, R.J.; Battle, K.E.; Thriemer, K.; Mendis, K. *Plasmodium vivax* in the Era of the Shrinking P. falciparum Map. *Trends Parasitol.* **2020**, *36*, 560–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- von Seidlein, L.; White, N.J. Taking on *Plasmodium vivax* malaria: A timely and important challenge. *PLOS Med.* **2021**, *18*, e1003593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ding, X.C.; Ade, M.P.; Baird, J.K.; Cheng, Q.; Cunningham, J.; Dhorda, M.; Drakeley, C.; Felger, I.; Gamboa, D.; Harbers, M.; et al. Defining the next generation of *Plasmodium vivax* diagnostic tests for control and elimination: Target product profiles. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Kashino, S.S.; Pollock, N.; Napolitano, D.R.; Rodrigues, V., Jr.; Campos-Neto, A. Identification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in urine of patients with active pulmonary tuberculosis: An innovative and alternative approach of antigen discovery of useful microbial molecules. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *153*, 56–62. [[CrossRef](#)]
26. Napolitano, D.R.; Pollock, N.; Kashino, S.S.; Rodrigues, V., Jr.; Campos-Neto, A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* ornithine carbonyltransferase in urine as a possible molecular marker of active pulmonary tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **2008**, *15*, 638–643. [[CrossRef](#)]
27. Pollock, N.R.; Macovei, L.; Kanunfre, K.; Dhiman, R.; Restrepo, B.I.; Zarate, I.; Pino, P.A.; Mora-Guzman, F.; Fujiwara, R.T.; Michel, G.; et al. Validation of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1681 protein as a diagnostic marker of active pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 1367–1373. [[CrossRef](#)]
28. Bernabeu, M.; Lopez, F.J.; Ferrer, M.; Martin-Jaular, L.; Razaname, A.; Corradin, G.; Maier, A.G.; Del Portillo, H.A.; Fernandez-Becerra, C. Functional analysis of *Plasmodium vivax* VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 386–400. [[CrossRef](#)]

## 6.3 Immunological characterization of a VIR protein family member (VIR-14) in *Plasmodium vivax*-infected subjects from different epidemiological regions in Africa and South America

### PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

#### RESEARCH ARTICLE

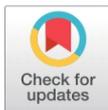
# Immunological characterization of a VIR protein family member (VIR-14) in *Plasmodium vivax*-infected subjects from different epidemiological regions in Africa and South America

Raianna F. Fantin<sup>1,2,3</sup>, Camila H. Coelho<sup>1\*</sup>, Anne D. Berhe<sup>1</sup>, Luisa M. D. Magalhães<sup>3</sup>, Dhélio B. Pereira<sup>4</sup>, Nichole D. Salinas<sup>1</sup>, Niraj H. Tolia<sup>1</sup>, Chanaki Amaratunga<sup>1</sup>, Seila Suon<sup>5</sup>, Issaka Sagara<sup>6</sup>, David L. Narum<sup>1</sup>, Ricardo T. Fujiwara<sup>3</sup>, Claudia Abejon<sup>7</sup>, Antonio Campos-Neto<sup>7,8</sup>, Patrick E. Duffy<sup>1\*</sup>, Lillian L. Bueno<sup>3\*</sup>

**1** Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, United States of America, **2** School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **3** Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **4** Center for Research in Tropical Medicine, Porto Velho, Brazil, **5** National Center for Parasitology, Entomology, and Malaria Control, Phnom Penh, Cambodia, **6** Faculty of Medicine and Odonto-Stomatology, University of Sciences, Techniques and Technology of Bamako, Bamako, Mali, **7** DetectoGen Inc., Westborough, Massachusetts, United States of America, **8** Cummings School of Veterinary Medicine, Tufts University, North Grafton, Massachusetts, United States of America

\* Current address: Assistant Professor—Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, United States of America

\* [patrick.duffy@nih.gov](mailto:patrick.duffy@nih.gov) (PED); [llbueno@icb.ufmg.br](mailto:llbueno@icb.ufmg.br) (LLB)



#### OPEN ACCESS

**Citation:** Fantin RF, Coelho CH, Berhe AD, Magalhães LMD, Pereira DB, Salinas ND, et al. (2023) Immunological characterization of a VIR protein family member (VIR-14) in *Plasmodium vivax*-infected subjects from different epidemiological regions in Africa and South America. *PLoS Negl Trop Dis* 17(4): e0011229. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229>

**Editor:** Abhay R. Satoskar, Ohio State University, UNITED STATES

**Received:** January 2, 2023

**Accepted:** March 9, 2023

**Published:** April 7, 2023

**Copyright:** This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

**Data Availability Statement:** All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its [supplementary information files](#)).

**Funding:** This work was supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)/National Institutes of Health (NIH) (ZIA AI001134-10 to PED); Coordination for the

## Abstract

*Plasmodium vivax* is a major challenge for malaria control due to its wide geographic distribution, high frequency of submicroscopic infections, and ability to induce relapses due to the latent forms present in the liver (hypnozoites). Deepening our knowledge of parasite biology and its molecular components is key to develop new tools for malaria control and elimination. This study aims to investigate and characterize a *P. vivax* protein (*PWVir14*) for its role in parasite biology and its interactions with the immune system. We collected sera or plasma from *P. vivax*-infected subjects in Brazil ( $n = 121$ ) and Cambodia ( $n = 55$ ), and from *P. falciparum*-infected subjects in Mali ( $n = 28$ ), to assess antibody recognition of *PWVir14*. Circulating antibodies against *PWVir14* appeared in 61% and 34.5% of subjects from Brazil and Cambodia, respectively, versus none (0%) of the *P. falciparum*-infected subjects from Mali who have no exposure to *P. vivax*. IgG1 and IgG3 most frequently contributed to anti-*PWVir14* responses. *PWVir14* antibody levels correlated with those against other well-characterized sporozoite/liver (*PvCSP*) and blood stage (*PvDBP-R11*) antigens, which were recognized by 7.6% and 42% of Brazilians, respectively. Concerning the cellular immune profiling of Brazilian subjects, *PWVir14* seroreactive individuals displayed significantly higher levels of circulating atypical ( $CD21^- CD27^-$ ) B cells, raising the possibility that atypical B cells may contribute to the *PWVir14* antibody response. When analyzed at a single-cell level, the B cell receptor gene *hIGHV3-23* was only seen in subjects with active *P. vivax* infection where it

Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (Finance Code 001 to RFF), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG, Brazil (Grant# CBB APQ-00766-18 to LLB), the Brazilian National Research Council (CNPq) (Grant# 421392/2018-5 and Grant# 302491/2017-1 to LLB), MCV, RCR, RTF, and LLB are Research Fellows from the Brazilian National Research Council (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

comprised 20% of V gene usage. Among T cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> levels differed (lower and higher, respectively) between subjects with versus without antibodies to *PvVir14*, while NKT cell levels were higher in those without antibodies. Specific B cell subsets, anti-*PvVir14* circulating antibodies, and NKT cell levels declined after treatment of *P. vivax*. This study provides the immunological characterization of *PvVir14*, a unique *P. vivax* protein, and possible association with acute host's immune responses, providing new information of specific host-parasite interaction.

**Trial registration:** TrialClinicalTrials.gov Identifier: [NCT00663546](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00663546) & [ClinicalTrials.gov NCT02334462](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02334462).

### Author summary

*Plasmodium vivax* is one of the main species causing malaria around the globe, thus the development of control tools are needed if progress is to be made towards malaria elimination. Among them, vaccines are a crucial one, since it's been proven that a well-established immunization program can save millions of lives a year. Although the development of vaccines against malaria have had substantial progress in the last decade, most of the efforts are concentrated towards *Plasmodium falciparum*. In this study, the authors aimed to investigate the potential role of a recently *P. vivax*-protein (*PvVir14*) discovered in the urine of infected subjects from the Brazilian Amazon. Initial findings showed that, although the protein elicits a higher frequency of antibodies among the Brazilian population (where it was first discovered), antibody titers were also found within African populations exposed and/or infected by *P. Vivax*. Interestingly, populations exposed to *P. falciparum* only did not have any immune responses against the protein, indicating that it is exclusive to *vivax*. Discovering key antigens is one of the most important steps towards the development of control tools. These findings provide the first characterization of naturally acquired antibody responses from different malaria regions against a new and promising target.

### Introduction

Despite numerous efforts to eradicate malaria, this disease is still a major cause of mortality and morbidity worldwide that is endemic in Sub-Saharan Africa, Southeast Asia, Middle East, Oceania, and Latin America. In 2021, an estimated 247 million cases of malaria occurred worldwide [1]. Specifically in Brazil, around 140,000 cases were registered in 2021 [2], the vast majority in the Amazon region. *Plasmodium vivax* is the most common human malaria species in Brazil, causing approximately 85% of the cases [2]. For many years, *P. vivax* infection was considered to be benign and often asymptomatic, but in recent years, severe cases of *P. vivax* malaria have been reported more frequently, not only in Brazil but in several endemic regions worldwide [3–5]. Among the symptoms associated with severe *vivax* malaria, the most common are anemia, thrombocytopenia, renal and hepatic dysfunction [6].

The recent increase in drug-resistant *P. vivax* strains [7], the evolution toward more virulent forms [8], the early production of gametocytes as well as the formation of hypnozoites with relapse potential [9], make *P. vivax* malaria a public health issue of increasing importance. An efficacious vaccine targeting *P. vivax* would be a potent and cost-effective tool to reduce transmission, and thus an important measure to control malaria [10]. However, despite its

wide distribution and new awareness of its virulence, minimal investments have been made in vaccine discovery for *P. vivax* compared with those for *P. falciparum*.

An efficient vaccine will protect from *P. vivax* through targeting sites of vulnerability or mechanisms of parasite virulence [11]. The Vir superfamily of *P. vivax* encompasses numerous surface proteins that have been related to parasite virulence [12,13], and associated with escape mechanisms through antigenic variation [14]. Significantly, proteins belonging to the Vir superfamily are exported to the surface of infected reticulocytes and can play a role in partial adhesion to host endothelial receptors, making these proteins accessible for immune recognition as well [15]. In prior studies, antibodies against Vir have been characterized as markers of exposure at a population level with a tendency to increase during acute infections [16]. Recently, a unique protein from *P. vivax*, named PvVir14 (from the Vir superfamily), was identified circulating in high levels during acute infection and recognized by *P. vivax* malaria patients [17].

Here, we determined that specific antibodies targeting the PvVir14 protein were present in a high proportion of sera/plasma from *P. vivax*-infected subjects in Brazil and in Cambodia. Considering the absence of previous immunological studies comparing different epidemiological regions, we characterized immune responses to PvVir14 at a serum and cellular levels to identify signatures of immunogenicity and assess the potential value of PvVir14 as a protein of interest.

## Methods

### Ethics statement

The studies involving human participants in Brazil were reviewed and approved by the Tropical Medicine Research Center (CAAEs: 0008.0.046.000–11, 0449.0.203.000–09) and the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (CAAE: 27466214.0.0000.5149), Brazil. The human study in Cambodia was approved by the Institutional Review Board (IRB), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAD), National Institutes of Health (NIH), and National Ethics Committee for Human Research (NECHR), Cambodia ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) Identifier: NCT00663546). Written informed consent was obtained from each participant. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

### Study population, clinical samples and ethical statements

The study population included 121 subjects living in the Brazilian Amazon and diagnosed with vivax malaria at the Research Center for Tropical Medicine (CEPEM) in Porto Velho, Rondônia, Brazil, in the years of 2014 (69 serum samples) and 2019 (52 serum samples and 22 PBMC samples) during the transmission season. The inclusion criteria in this study included acute illness at the time of blood sampling and presence of *P. vivax* parasites assessed by blood smear microscopy. Serum samples from 15 healthy donors living in the same area were collected and defined as the “malaria-exposed” experimental group. Healthy subjects (N = 5) from Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, a non-endemic area for malaria, were also recruited as malaria-naïve controls (2019–2021). This study was approved by the Research Ethics Council of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CAAE 27466214.0.0000.5149). For some experiments, samples collected in Brazil were frozen and transported on dry ice to the U.S. National Institutes of Health (NIH), Bethesda MD, USA.

Sera collected from 55 *P. vivax* infected subjects (3–55 years old) in Pursat, Cambodia, between 2008 and 2018, under a protocol approved by NIAID and the National Ethics Committee on Human Research ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) NCT00663546), were used to perform IgG

ELISA assays against P<sub>v</sub>Vir14. Sera from 28 Malian adults (range of age: 18–55 years old) collected between 2015 and 2019 were used to investigate reactivity to P<sub>v</sub>Vir14 and were approved for use under a protocol approved by the NIAID IRB and the University of Bamako (FMPOS) Ethical Review Committee, and the study registered at ClinicalTrials.gov (NCT02334462).

An additional malaria-naive control group included healthy adult subjects (N = 5) who donated samples during participation in clinical studies at the U.S in 2020. NIH (Bethesda, MD).

Each volunteer was required to sign a written informed consent specific to this study, and blood was obtained upon receiving the said document.

### Expression and purification of P<sub>v</sub>Vir14, P<sub>v</sub>DBP-RII, P<sub>v</sub>CSP and P<sub>v</sub>s230D1

The full-length (325 amino acids) predicted P<sub>v</sub>Vir14 protein was expressed in *Escherichia coli*. Briefly, the recombinant plasmid with the PUC/P<sub>v</sub>Vir14 synthetic gene (GenScript) was resuspended and transformed with competent cells from *E. coli* XL-1 Blue (Phonutria, Brazil). Positive clones were confirmed through digestion using Xho1 and Nhe1 enzymes. The P<sub>v</sub>Vir14 insert was then cloned into a bacterial expression vector (pET28aTEV) and transformed with competent *E. coli* BL21-star (Thermo Fisher Scientific, USA) by electroporation (Bio-Rad Laboratories, USA). To confirm gene insertion, a colony PCR was performed using T7 primers (Macrogen, South Korea). To produce at large scale, 1mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added following an incubation period of 3h at 37°C at 180rpm. Cells were ruptured by a high-pressure homogenizer and soluble fractions were obtained by centrifugation. The recombinant protein was purified using Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography with HisTrap HP 5 mL column (GE Healthcare, USA) coupled to an ÄKTA Prime Plus system (GE Healthcare, USA). The purified P<sub>v</sub>Vir14 protein, having 325 amino acids and predicted molecular weight of 37kDa, was separated by SDS-PAGE. P<sub>v</sub>s230D1M (domain 1 from Sal-1 strain) and P<sub>v</sub>CSP (VK210 allele) were expressed in *Pichia pastoris* following similar procedures previously described for P<sub>f</sub>s230D1M and P<sub>f</sub>CSP [18,19] and the details for their production will be reported elsewhere. P<sub>v</sub>DBP-RII was expressed in *E. coli* BL-21 cells and refolded as previously described [20,21].

### Detection of IgG and IgM antibodies by enzyme-linked assay (ELISA)

The presence of P<sub>v</sub>Vir14-IgG and IgM in serum was determined through a conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed as follows: 96-well plates were coated with antigen (0.5μg/mL) in carbonate buffer overnight at 4°C. Wells were then blocked with 0.5M chloride, 1% Triton X-100 and 1% bovine serum albumin in PBS (1X) and incubated for 2 hours at room temperature (RT) followed by incubation with the primary antibody at a concentration of 1:500 for IgG and 1:100 for IgM (serum from infected subjects). After washing 4 times with PBS (1X) plus 0.05% Tween 20, a peroxidase HRP-conjugated secondary antibody was added at a concentration of 1:10000 (IgG) and 1:8000 (IgM) and incubated for 1 hour at RT with shaking. The plate was washed 4 more times with 1X PBS Tween (0.05%) before the developing reagent (3,3', 5'5 -Tetramethylbenzidine (TMB), SeraCare) was added to each well. The reaction was stopped after 15 minutes at RT by the addition of a TMB stop solution (SeraCare) and the optical density was measured at 450nm.

ELISA assays to detect the IgG subclasses were performed as previously described [22]. Sera were diluted at 1:50 and evaluated for each IgG subclass using the following mouse anti-human monoclonal antibodies: IgG1 clone 8c/6-39; IgG2 clone HP-6014; IgG3 clone HP-6050; IgG4 clone HP-6025) (Sigma, St.Louis, MO) according to the manufacturer's

instructions. Monoclonal antibody binding was detected with TMB peroxide substrate solution (Thermo Fisher). The *cut-off* value for detection was determined by testing 5 different negative control sera from subjects never exposed to malaria from Bethesda MD, United States of America. The mean optical density value at 450 nm  $\pm$ 3SD (VersaMax Microplate Reader) for duplicate determinations in negative sera was used as the cut-off value for different subclasses.

### Flow cytometry analyses of PBMCs from *P. vivax* infected, treated, or exposed subjects

We examined whether cellular immune responses were related to P<sub>v</sub>Vir-14 seroreactivity among *P. vivax*-infected or exposed individuals, using flow cytometry and a panel of markers for the main B and T cell subtypes. The population was stratified by exposure, infection and seroreactivity status: P<sub>v</sub>Vir14+ (corresponding to those with acute infection and high IgG titers for P<sub>v</sub>Vir14; n = 8); P<sub>v</sub>Vir14- (infected subjects with titers below the level of detection for P<sub>v</sub>Vir14; n = 7); and HD (healthy donors in non-endemic areas—USA, n = 5; Brazil, n = 5). PBMCs were thawed in a 37°C water bath, resuspended in complete RPMI, and then in PBS. Cells were stained with the following antibodies: CD3 FITC (clone SK7), CD4 PerCP-Cy5.5 (clone SK3), CD8 APC-Cy7 (clone SK1), CD14 AlexaFluor700 (clone HCD14), CD16 PE-Cy7 (clone 3G8), CD19 BV605 (clone HIB19), CD21 BV711 (clone B-ly4), CD27 APC (clone LG3A10), and CD56 BV785 (clone 5.1H11). All antibodies are from BioLegend, except for CD21 BV711 (clone) which is from BD Biosciences. Cells were also stained with Zombie UV fluorescent dye (BioLegend) to assess live vs. dead cells. Cells were incubated at 4°C protected from light for 20 minutes while staining and then washed with PBS and resuspended in FACS Buffer. Flow cytometry was performed on a LSRII instrument (BD Biosciences) and analysis was done using FlowJo v.10. Cells were first gated for singlets by FSC-H and FSC-A, followed by live cells (FSC-A, live/dead) and lymphocytes (SSC-A and FSC-A). Monocytes were gated out of total lymphocytes. B cells were thereafter gated as CD19<sup>+</sup> followed by CD27 and CD21 to distinguish (i) classical memory B cells (CD27<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup>), (ii) activated memory B cells (CD27<sup>+</sup> CD21<sup>-</sup>), (iii) atypical memory B cells (CD27<sup>-</sup> CD21<sup>+</sup>), (iv) naive B cells (CD27<sup>-</sup> CD21<sup>-</sup>). T cells (CD3<sup>+</sup>) were gated out of total lymphocytes and thereafter as CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) and NKT subsets (CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) (S1 Fig). Data analysis was followed by dimensionality reduction and visualization by t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE) or Principal Component Analysis (PCA) using Cytokit [23].

### VDJ sequencing of memory B cells

Amplification of BCR heavy and light chains from single sorted B cells was performed by iRepertoire Inc. (Huntsville, AL, USA) as previously described [24]. Briefly, RT-PCR1 was performed with nested, multiplex primers covering both heavy, kappa, and lambda loci, and including partial Illumina adaptors. After RT-PCR1, the first round PCR1 products were rescued using SPRISelect Beads (Beckman Coulter, Brea, USA). A second PCR was performed with dual-indexed primers that complete the sequencing adaptors introduced during RT-PCR1 and provide plate positional information for the sequenced products. Sequencing was performed using the Illumina MiSeq v2 500-cycle kit with 250 paired-end reads.

### Statistical analysis

The Reactivity Index (RI), used to define positivity in serology assessments, was calculated by dividing the mean OD of the assessed subjects by the mean OD plus 3 standard deviations (SD) of the malaria-naïve control subjects (Confidence Interval of 99%). Values above 1 were

considered positive. Samples were submitted to a normality test to define statistics. For non-normal data or non-equal variances among groups (3 or more groups), a Kruskal-Wallis test was performed. For normal data with equal variances, we performed ANOVA or, for comparison between 2 groups, T test. To determine equality of variances among normal populations, a Fisher's exact test was performed, and considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Epidemiological profile of selected subjects

The study population is composed of 121 *P. vivax*-infected adults from Porto Velho-Rondônia, Brazil and neighboring municipalities; 15 non-infected but exposed subjects from Porto Velho-Rondônia, Brazil; 5 non-infected and never exposed subjects from Belo Horizonte-Minas Gerais, Brazil; 55 *P. vivax*-infected adults and children from Pursat, Cambodia; 28 *P. falciparum*-infected adults from Bancoumana, Mali, West Africa; and 5 non-infected and never exposed subjects from Bethesda-Maryland, United States of America (Table 1). Concerning the infected Brazilian population, the majority were adults naturally exposed to malaria (*P. vivax* and/or *P. falciparum*) and the age range was 29–49 years. The sex ratio was 1:3 (female: 23.9%; male: 76.1%). The non-infected but currently exposed had an age range of 20–47 with a sex ratio of 2.6:1 (female: 72.22%; male: 27.77%). The non-infected/never exposed had an age range of 26–32, and a sex ratio of 1:1.5 (2 female, 3 male). For the Cambodian population, the range age was 3–55, and a sex ratio of 1:1.75 (female: 36.36; male: 63.63%). As for the Malian population, the age range was 18–55 with a sex ratio of 1:3.4 (female: 22.8%; male: 77.2%). Finally, the American population was all males with age range 49–53 years, and the bias was merely due to sample availability. For the endemic regions, considering that the main factor to be enrolled was an acute infection, we observed a clear male bias within infected populations, which is a common feature for vertebrates [25]. Among the sexual differences that can cause such bias are hormones, immunity, and exposure. The latter is well-known in malaria, as

**Table 1. Epidemiological and demographic characteristics of the subjects selected for the study.**

Epidemiological and demographic characterization	
<b>Brazil: <i>P. vivax</i>-infected subjects (n = 121)</b>	
Age range, years	29–49
Sex, female:male	1:3
<b>Brazil: <i>P. vivax</i> non-infected but exposed subjects (n = 15)</b>	
Age range, years	20–47
Sex, female:male	2.6:1
<b>Brazil: malaria-naïve subjects (n = 5)</b>	
Age range, years	26–32
Sex, female:male	1:1.5
<b>Mali (n = 28)</b>	
Age range, years	18–55
Sex, female:male	1:3
<b>Cambodia (n = 55)</b>	
Age range, years	3–55
Sex, female:male	1:1.75
<b>United States of America: malaria-naïve subjects (n = 5)</b>	
Age range, years	49–53
Sex, female:male	0:1

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229.t001>

vector-borne parasitic infections are intrinsically related to the complex and active role of the vectors plus host behavior traits.

### **IgG response to PvVir14 among subjects infected with *Plasmodium* spp. and *P. vivax* exposed without acute infection**

Among 121 *P. vivax*-infected subjects in Brazil, 74 (61%) had detectable IgG against PvVir14, compared to 19 out of 55 (34.5%) Cambodian subjects. To confirm that PvVir14 is a specific and exclusive target of *P. vivax*, sera from 28 *P. falciparum* infected subjects from Mali (Western Africa) were tested; *P. vivax* infections have not been reported at the study site in Mali. Of 28 sera tested, none were reactive to PvVir14, consistent with their lack of prior exposure to *P. vivax* and the absence of a *P. falciparum* ortholog for this protein. To assess whether PvVir14 seroreactivity is present even without an acute infection, we assayed sera collected from 15 uninfected subjects living in *P. vivax* endemic areas for anti PvVir14-IgG levels. Five subjects (33%) had detectable antibody titers three of the five seroreactive had a known history of prior clinical malaria, which might explain the presence of circulating antibodies, while the malaria history for the other two subjects is unknown (Fig 1A).

### **Anti-PvVir14 IgM is detected in *P. vivax*-infected individuals**

We investigated IgM antibodies targeting PvVir14. During *P. vivax* acute infection, 32 out of 119 Brazilian subjects (26.9%) displayed PvVir14-IgM antibodies in their sera (Fig 1B); samples from 2 of the 121 subjects had been exhausted before IgM testing.

### **IgG1 and IgG3 responses are dominant in response to PvVir14**

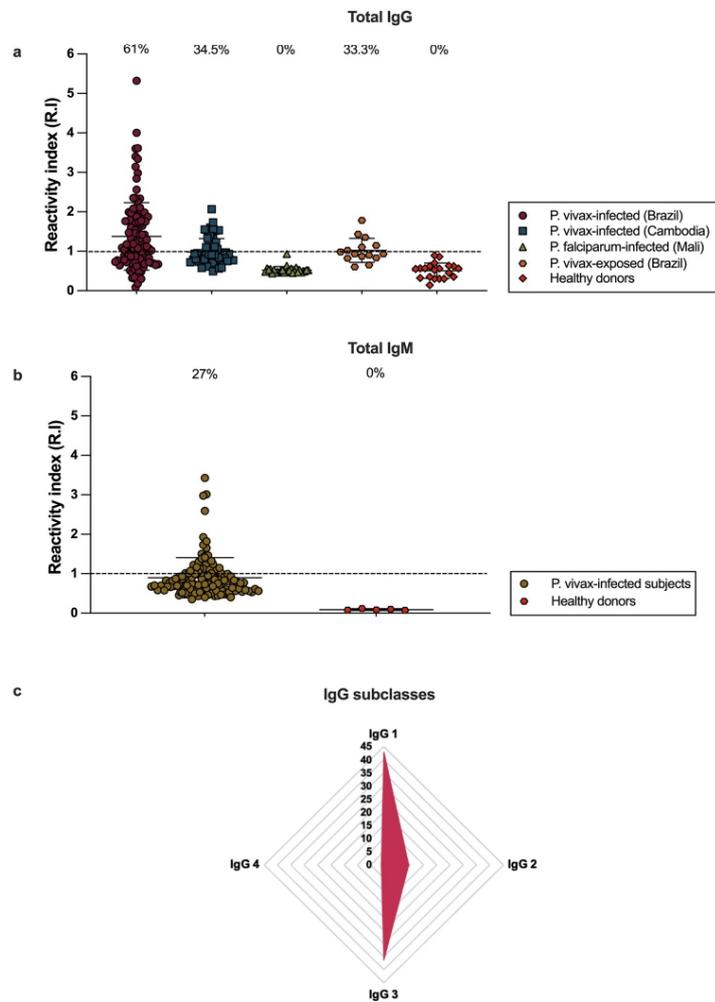
The functionality of antimalarial IgG antibodies may depend on their subclass [26]. We assessed IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels within the *P. vivax*-infected individuals from Rondônia, Brazil. Detectable IgG1 (42.85%) and IgG3 levels (36.13%) were most frequent, while IgG2 (frequency of 9.24%) was less frequent and IgG4 (0.84%) was detected in a single individual (Fig 1C).

### **PvVir14-IgG titers correlate to other *P. vivax* protein-IgG titers**

We compared IgG reactivity to PvVir14 with IgG reactivity to other *P. vivax* proteins, including well-characterized vaccine candidates from sporozoite/liver (PvCSP), blood (PvDBP-R11) and mosquito-sexual stages (Pvs230D1). In ELISA assays to measure total IgG, the positivity rates were as follows: 61% for PvVir14, 7.6% for PvCSP, 42% for PvDBP-R11 and 3.3% for Pvs230 domain 1 (Fig 2A). The frequency of seroreactivity during infection was significantly higher for PvVir14 compared to the three proteins analyzed here (PvCSP: <0.0001, PvDBP-R11: 0.0003, Pvs230: <0.0001, Fisher's exact test). In addition, a statistically significant but weak correlation between PvVir14-IgG levels and IgG levels to the sporozoite/liver and blood stage proteins was observed (PvCSP,  $p = 0.0077$ ;  $r = 0.2442$  and PvDBP,  $p = 0.0042$ ;  $r = 0.2614$ , Spearman rank test) (Fig 2B and 2C), but not to the sexual stage Pfs230D1 protein (Fig 2D).

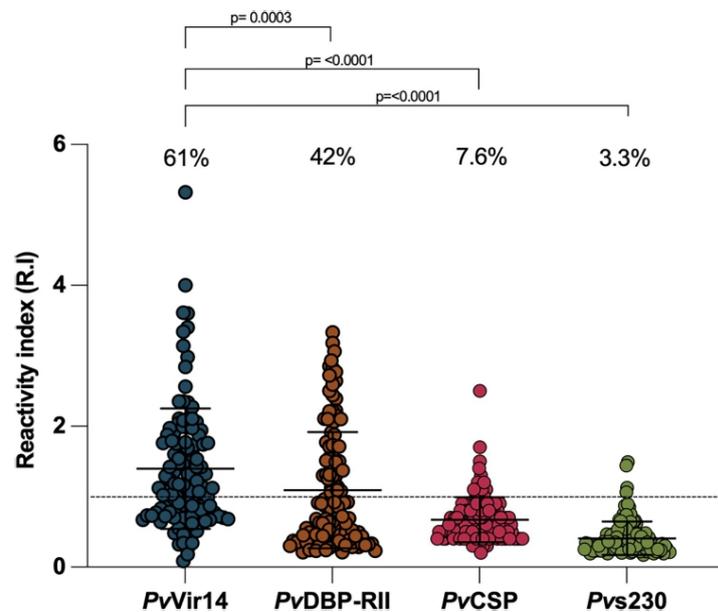
### **Proportion of atypical B cells (AtMBCs) differ based on *P. vivax* infection**

B cells were clustered in 4 groups: Classical, Naïve, Activated, and Atypical (Fig 3A) based on levels of CD21 and CD27 expression (Fig 3B). Total B cells (as a proportion of live cells) were elevated in infected Brazilian subjects when compared to malaria-naïve healthy U.S. donors (Fig 3C), with the highest proportions seen in the PvVir14+ group ( $p = 0.022$ , One-way



**Fig 1. Relative quantity of anti-*PvVir14* IgG and IgM antibodies, and prevalence of IgG subclasses to *PvVir14*.** a) Subjects from the Brazilian Amazon ( $n = 121$ , Porto Velho—RO) and from Cambodia ( $n = 55$ ) with an acute infection by *P. vivax*—IgG titers; Subjects from Western Africa (Mali) with an acute infection by *P. falciparum* ( $n = 28$ )—IgG titers; and subjects living in the Brazilian Amazon (Porto Velho—RO), thus exposed to *P. vivax* but not infected at the moment of collection ( $n = 15$ ). b) Subjects from the Brazilian Amazon (Porto Velho—RO) with an acute infection by *P. vivax* ( $n = 119$ )—IgM titers. For a and b, Y axis represents the mean reactivity index (RI) and the dotted line shows the seropositivity threshold (RI = 1). c) Frequency of detectable IgG subclasses against *PvVir14* among infected Brazilian subjects. The radar charts are divided into nine lines, each of them representing a 5% value, data are presented (orange rhomboid) as the percentage of individuals ( $n = 121$ ) with detectable levels for the four IgG subclasses against *PvVir14*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229.g001>



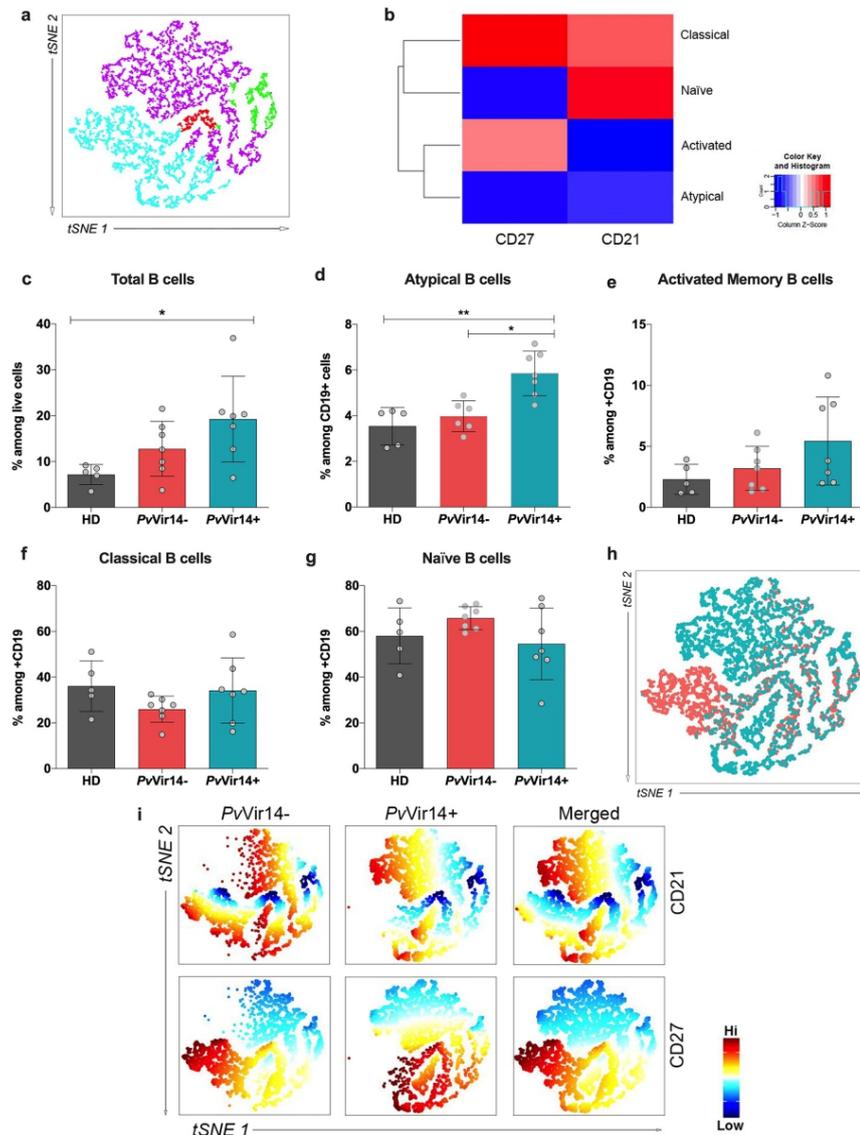
**Fig 2. Seroreactivity to *PvVir14* versus other *P. vivax* candidate vaccine antigens (*PvCSP*, *PvDBP-RII* and *Pvs230D1*).** (a) IgG Reactivity Index against *P. vivax* antigens in *P. vivax* infected subjects. For (b-d), mean OD of anti-*PvVir14* IgG versus (b) mean OD of anti-*PvCSP*, (c) mean OD of anti-*PvDBP-RII* (d) mean OD of anti-*Pvs230D1*. The dotted line marks the minimum value of the mean OD for a subject to be considered above the level of detection ( $> 1$ , R.I) Data were analyzed considering a 99% confidence interval (CI).  $P < 0.05$  was considered significant (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229.g002>

ANOVA). Among the B cell subpopulations, AtMBCs (as a proportion of total B cells) were higher for the *PvVir14*<sup>+</sup> subjects in comparison to the other two groups (*PvVir14*<sup>-</sup> vs *PvVir14*<sup>+</sup>,  $p = 0.028$ ; HD vs *PvVir14*<sup>+</sup>,  $p = 0.0039$ ; Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test) (Fig 3D), suggesting a relationship between *PvVir14* seroreactivity and AtMBCs. Proportions of other B cell subsets did not differ significantly on the basis of *PvVir14* seroreactivity, although there were trends for activated memory B cells to increase in the *PvVir14*<sup>+</sup> group and for naïve B cells to increase in the *PvVir14*<sup>-</sup> group (Fig 3E–3G). These latter trends were also observed through the t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE) analysis, which demonstrated higher intensity of CD21 in *PvVir14*<sup>+</sup> group while *PvVir14*<sup>-</sup> showed higher intensity of CD27 (arrows) (Fig 3H and 3I)

#### CD4<sup>+</sup> T cell, CD8<sup>+</sup> T cell, and NKT cell frequencies vary with *PvVir14* seroreactivity

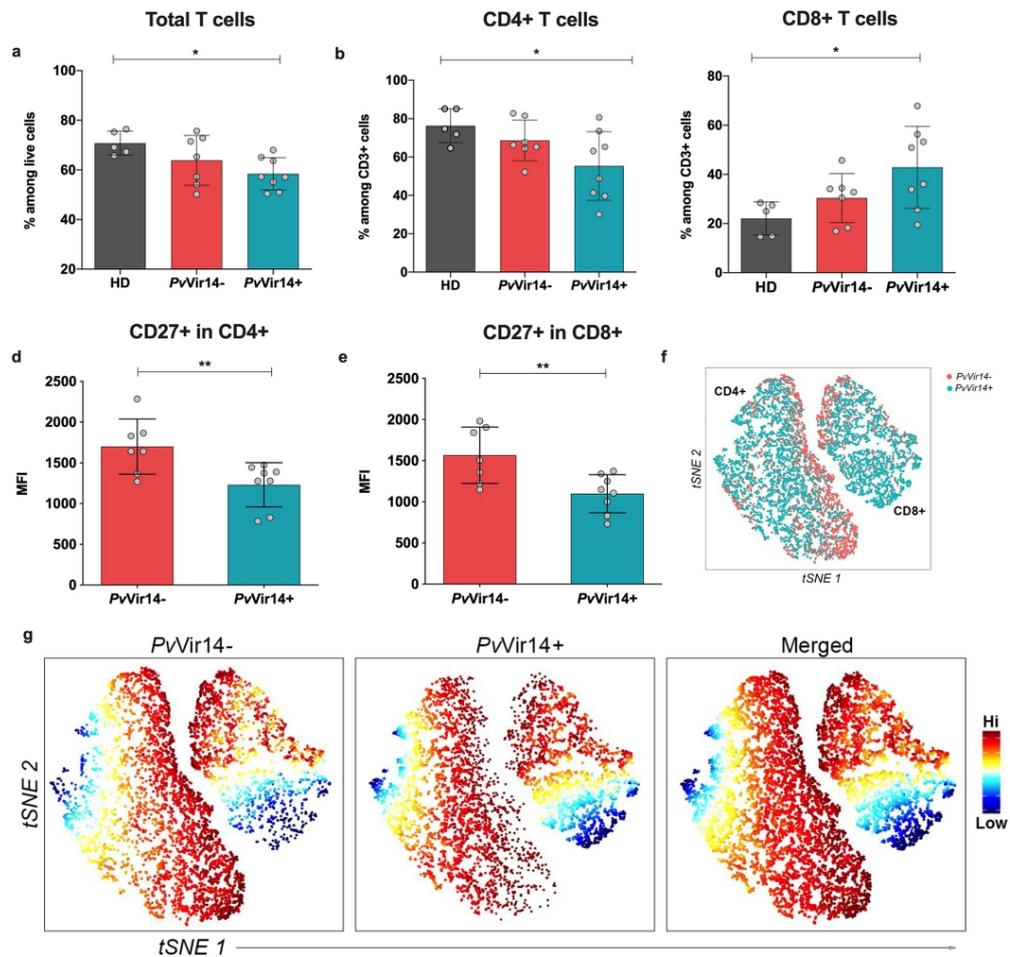
T cells can re-distribute and levels can fluctuate during malaria infections [27–29]. In our *P. vivax*-infected participants, total T cell levels (as a percentage of all live cells) were lower than those of uninfected U.S. donors, but this difference was only statistically significant for the *PvVir14*<sup>+</sup> group ( $p = 0.030$ , One-Way ANOVA) (Fig 4A). When measured as a proportion of total CD3<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells were lower and CD8<sup>+</sup> T cells were higher in the *PvVir14*



**Fig 3. B cell phenotypic analysis by multiparametric flow cytometry.** (a) Unsupervised high dimensional analysis of flow cytometry data (tSNE) from combined data from all B cells populations. Activated (red), Atypical (green), Classical (light blue), and Naive (purple). (b) Heatmap showing marker expression within each cluster previously identified among B cells. (c) Bar graphs shows percentage of CD19<sup>+</sup> (d), Atypical Memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> (e), Activated Memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> (f), Classical Memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> (g) and Naive B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> from total Live PBMC cells. (h) Unsupervised high dimensional analysis

of flow cytometry data (tSNE) from combined data of acute infected subjects with or without antibody titers against PwVir14 gated on LiveCD19<sup>+</sup>. The darker the color (reddish), the greater the intensity of expression. (i) Diffusion map of CD21 (top) or CD27 (bottom) intensity of expression depicting each group (PwVir14+: n = 7, PwVir14-: n = 7); and merged plot. P < 0.05 was considered significant (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229.g003>



**Fig 4. T cell phenotypic analysis by multiparametric flow cytometry.** Bar graphs show percentage of CD3<sup>+</sup> T cells (a) CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (b) and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells (c) from total Live PBMCs. Bar graphs show Mean Intensity Fluorescence (MFI) of CD27<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> (d) or CD8<sup>+</sup> (e). (f) tSNE from combined data of PwVir14<sup>+</sup> (green) or - (red) subjects gated on LiveCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T cells. (g) Expression map of CD27<sup>+</sup> cells from F depicting PwVir14- (left), PwVir14+ (middle) and Merged (right). The increasing intensity of red color indicates higher CD27 signal, and the increasing intensity of blue color indicates decreasing CD27 signal. Grey bars represent Healthy Donors (HD), red bars represent PwVir14- and green bars represent PwVir14+ subjects. P < 0.05 was considered significant (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229.g004>

+ group (Fig 4A and 4C). Based on Mean Fluorescence Intensity (MFI), CD27<sup>+</sup> expression level was significantly lower in *PvVir14+* versus *PvVir14-* individuals for both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> ( $p = 0.010$  and  $p = 0.007$  respectively, T test) (Fig 4D and 4E). When using a t-stochastic neighbor embedding (tSNE) to reduce dimensionality, the data analysis resulted in the identification of 2 clusters corresponding to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig 4F) and a closer examination at the single-cell level confirmed that the *PvVir14-* group indeed is expressing a higher intensity of CD27<sup>+</sup> on CD4 and CD8 T cells than *PvVir14+* (Fig 4G).

As Natural Killer (NK) cells are known to be one of the first innate cells that respond to malaria parasites [30], helping activate adaptive responses, its population was also assessed. NK and Natural Killer T (NKT) cells were defined as CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, respectively, and constituted 2 clusters (Fig 5A). Measured as a proportion of all live cells, NK cells did not differ significantly between groups (Fig 5B), whereas NKT cells were significantly higher in the *PvVir14-* group than *PvVir14+* group ( $p = 0.041$ , t test) (Fig 5C). Of interest, subjects who lack circulating antibodies against *PvVIR14* have higher expression of CD27<sup>+</sup> on cells when compared to those presenting serological reactivity to the protein; no difference was observed regarding CD16<sup>+</sup> (Fig 5E).

### B cell subsets, *PvVir14* circulating antibodies, and NKT population decline in Brazilian subjects after drug treatment

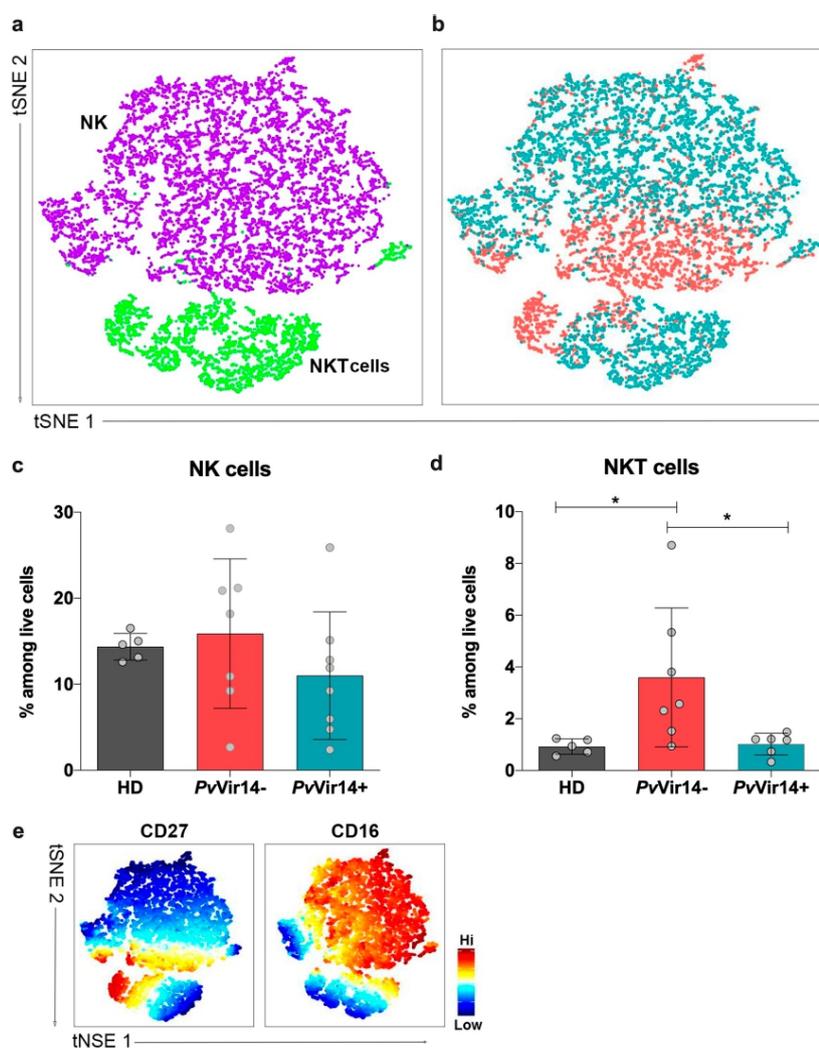
Upon the diagnosis of acute malaria, all subjects in this study received treatment consisting of Primaquine and Chloroquine (Fig 6A). Forty days after starting the treatment, serum *PvVir14*-IgG levels had significantly decreased among 8 individuals who returned for a follow up visit ( $p = 0.0078$ , Wilcoxon matched-pairs) (Fig 6B). Two subjects (beige dots) presented with parasitemia at the time of the post-treatment follow-up. Since *P. vivax* is known to cause relapses frequently, the parasitemia at follow up may represent a new infection, a relapse of liver hypnozoites present at the time of first diagnosis, or a recrudescence of blood-stage parasites that were not cleared at the first treatment. The two subjects presenting with infection at the follow up visit were treated according to the therapeutic scheme in Brazil (Primaquine + Artemether-Lumefantrine).

Among the 8 returning subjects, immune cell samples from 4 were available for phenotypic characterization followed by tSNE and clustering analysis. The distribution of cells in the tSNE plots differed at the time of acute infection versus follow up (Fig 6D). Following antimalarial treatment, CD21<sup>+</sup> expression decreased in naïve and classical B cell subsets (Fig 6E and 6F).

In addition, although there is visual suggestion of a decrease in NKT cells in drug-treated subjects, the difference is not observed when assessed as a percentage among live cells (Fig 6G). Levels of NK cells were significantly increased as observed in the percentage of live cells ( $p < 0.0001$ , T test) in the drug-treated group (Fig 6H). Critically, the results should be seen as a trend, since the sample size of this group was low when compared to the initial number of patients enrolled.

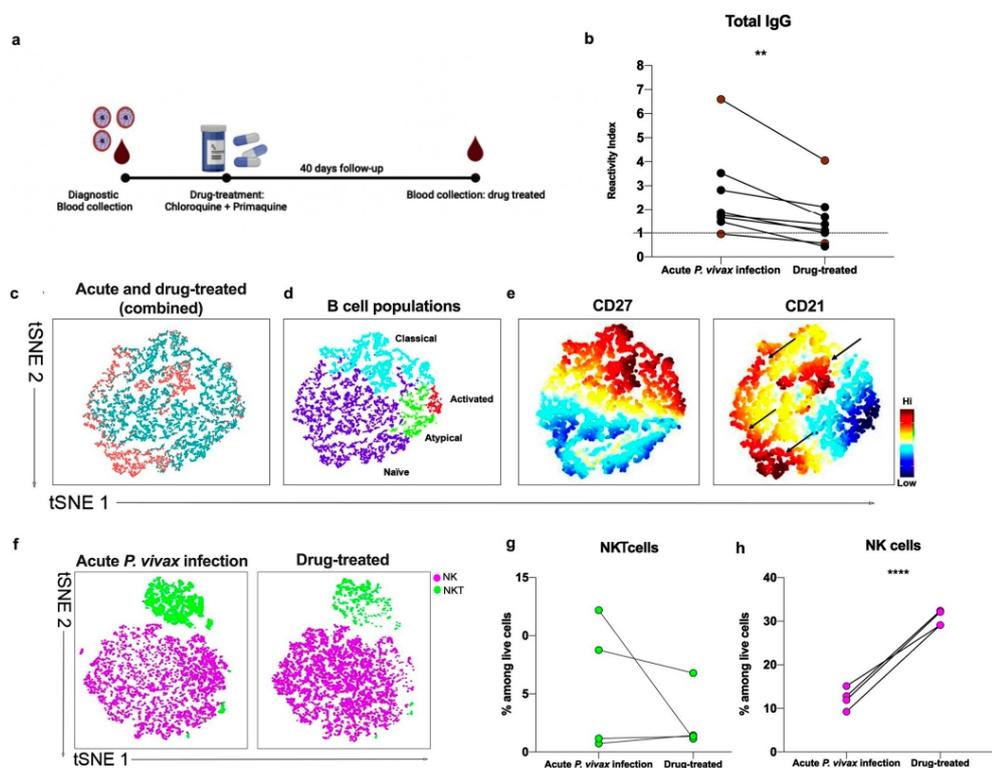
### Memory B cell V gene usage and CDR3 length during *P. vivax* infection

To further characterize the B cell response in *P. vivax* infected subjects, single memory B cells were sorted from PBMCs of (i) two subjects with acute infection and high titers against *PvVir14* from the Brazilian Amazon; (ii) two non-infected subjects from the USA (Fig 7A). All four subjects had their V fragment (of its VDJ genes) and CDR3 region amplified using RT-PCR. When comparing lengths of CDR3, the major site for repertoire variation, *P. vivax*-infected subjects and healthy donors did not differ (USA) (Fig 7B). As for the heavy chain



**Fig 5. NK and NKT cell population dynamics by multiparametric flow cytometry.** (a) tSNE from combined data of *Pv*Vir14<sup>+</sup> or *Pv*Vir14<sup>-</sup> subjects gated on CD19 CD14<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK (purple) and NKT cells (green). (b) tSNE from (a) depicting *Pv*Vir14<sup>+</sup> (red) and *Pv*Vir14<sup>-</sup> (blue) cells. (c) NK cells (CD3<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) as a percentage of live cells, by group. (d) NKT cells as a percentage of live cells, by group. (e and f) Expression levels of distinguishing markers of NK and NKT cells.  $P < 0.05$  was considered significant (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

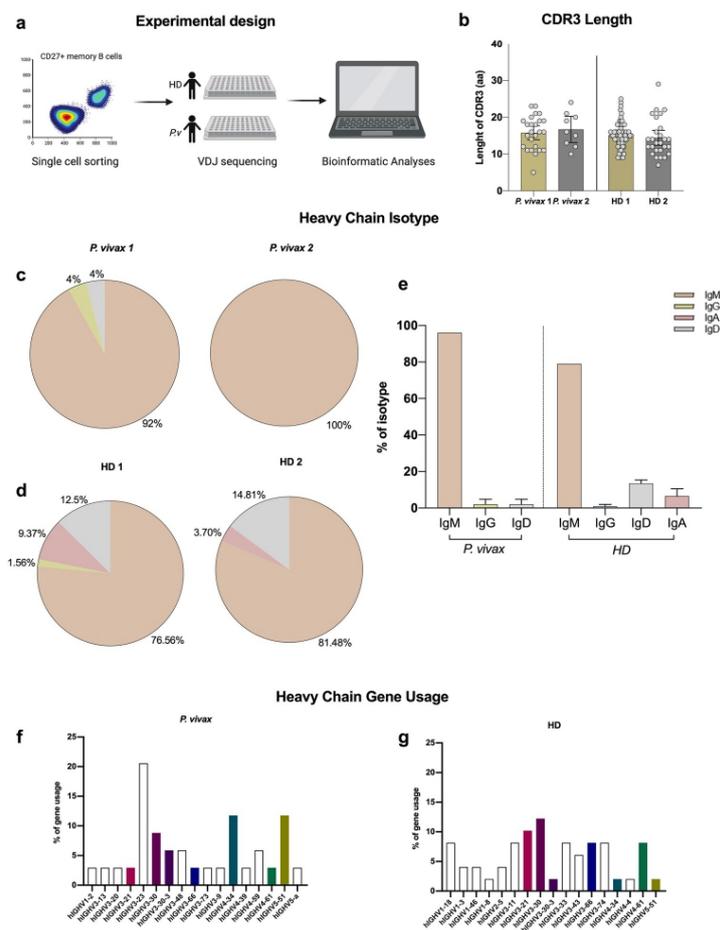
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229.g005>



**Fig 6. Drug-treated subjects' profile for antibody titers, B cells, and NK and NKT cells.** (a) Sample collection and therapeutic scheme. Created with [BioRender.com](https://BioRender.com). (b) Total IgG levels from two different points in time: acute infection and post-drug treatment. Serum samples were paired and belonged to the same subjects (acute and post-treatment samples). Two subjects, represented in purple, were also infected at the follow-up 40 days after primary acute infection. (c) tSNE from combined data of *Pv*Vir14+ during acute (red) or post treatment (blue) gated on Live CD19<sup>+</sup> B cells. (d) tSNE from (c) depicting B cell populations Atypical Memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> (green), Activated Memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> (red), Classical Memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> (light blue) and Naive B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup> (purple). (e) Expression plot of distinguish markers CD27 (left) and CD21 (right). The arrows indicate populations with higher CD21 expression. (f) tSNE from combined data of *Pv*Vir14+ during acute (left plot) or post treatment (right plot) gated on LiveCD19<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> showing NK CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (purple) and NKT CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (green) cells. (g) Percentage of NKT cells among live cells in Acutely infected and Drug-treated subjects. (h) Percentage of NK cells among live cells in Acutely infected and Drug-treated subjects. The data were analyzed considering a 99% confidence interval (CI).  $P < 0.05$  was considered significant. (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229.g006>

isotype, IgM was most commonly detected for all subjects, particularly for *P. vivax*-infected individuals, albeit group differences were not significant in this small sample size (Fig 7C–7E). Concerning heavy chain gene usage, 17 genes from *P. vivax*-infected subjects and 17 genes from non-infected subjects (HD) were identified. Seven genes were shared between the two groups: hIGHV3-21, hIGHV3-30, hIGHV3-33, hIGHV3-66, hIGHV4-34, hIGHV4-61, hIGHV5-51 (Fig 7F and 7G). One V gene unique to the infected individuals—hIGHV3-23—comprised 20% of gene usage for those two subjects. The gene hIGHV4-59, already found in other malaria-infected populations around the world [31], was also detected in the infected but not uninfected donors.



**Fig 7. B cell receptors: CDR3 length, isotypes and V gene usage.** (a) Experimental design of the sorting process. Single CD27+ memory B cells of two *P. vivax*-infected subjects with the highest anti-PvVir14+ IgG titers, and two malaria-naïve U.S. subjects, were sorted into a 96-well plates and had V gene usage analyzed. Created with [BioRender.com](https://BioRender.com). (b) Length of CDR3 sequences of two *P. vivax*-infected subjects (*P. vivax* 1 and *P. vivax* 2) from the Brazilian Amazon and two healthy donors (HD1 and HD2) from the U.S. The y axis represents the absolute number of amino acids in individual B cells as well as the mean for all BCR sequenced from each subject. (c) Heavy chain isotype of BCR sequenced from two *P. vivax*-infected subjects, presented in pie charts as proportions. (d) Heavy chain isotypes of BCR sequenced from two HD donors, presented in pie charts as proportions. (e) Heavy chain isotyping of all four subjects analyzed (two *P. vivax*-infected and two HD). The y axis represents the percentage of BCR belonging to specific antibody classes. (f) Heavy chain gene usage of BCR sequenced for two *P. vivax*-infected subjects. (g) Heavy chain gene usage of all BCR sequenced in the two group. Open bars indicate V genes unique to a group; colored bars indicate V genes shared between the groups, and the colors correspond to the same V gene in each group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011229.g007>

## Discussion

*P. vivax* has attracted increasing attention as the awareness of severe and lethal cases increased [29], and this parasite accounts for ~13% of the cases in Africa and >70% of cases in Asia and in the Americas [1]. Nevertheless, *P. vivax* receives little attention when compared to *P. falciparum*. While vaccines could be a valuable tool for control of *P. vivax* [32] when used with other measures such as timely diagnosis and access to treatment [33], only a few *P. vivax* candidates are in clinical and pre-clinical phases (including PvDBP1I, PvDBP1I/GLA-SE, *P. vivax* irradiated sporozoites, PvCSP-derived long synthetic peptides, VMP001-AS01B and Pvs25) [30].

In the present study, a member of a *P. vivax* variant antigen family (Vir) was detected in patients' urine and was assessed for seroreactivity and related immunological profiles. Pathogen proteins detected in body fluids during infection are widely used as biomarkers of different infections [34]. Although it is well known that Vir proteins are extremely diverse, their functions and localizations are mainly unknown [16]. The fact that Vir is a superfamily carrying genes that differ greatly in size and number of exons [35] indicates that the proteins within the families might differ in function and, consequently, in immunogenicity.

Here, we observed that the prevalence of PvVir14 IgG antibodies during acute infection was 61% in Brazil and 34.5% in Cambodia. The greater prevalence in the Brazilian Amazon population is probably due to the different transmission setting when compared to Cambodia. While Brazil is known to have a high API (Annual Parasite Index) in endemic regions such as Rondonia [36], prevalence of this parasite in Cambodia has decreased in the last decade [37]. Another fact worth mentioning when discussing the antibody prevalence among those two different populations is that the Cambodian one comprises subjects under the age of 5 (age range 3–55), while the youngest Brazilian subject is 29 years old. It is well known that humoral immunity against malaria is dependent on age and exposure, but the cumulative number of episodes is also a main factor [38]. A serological study assessing other Vir proteins in Brazilian subjects found a frequency of detectable IgG of 26% [39], a lower prevalence than that observed in our study. Notably, when assessed in a *P. falciparum*-infected population in high-transmission Mali that is not exposed to *P. vivax*, none of the subjects recognized the protein, confirming that PvVir14 responses are exclusive to *P. vivax*. Besides IgG, a significant percentage (27%) of *P. vivax*-infected subjects from Brazil also displayed IgM antibodies against PvVir14. Although the IgM role in protective immunity against malaria is still unclear, IgM to the surface of merozoites inhibits binding in a complement-dependent manner and reduces the odds of clinical malaria [38]. Nonetheless, the role of IgM responses may vary according to the antigen, parasite life stage and host genotype [40,41]. While some studies in *falciparum* malaria have shown that IgM levels decline shortly after acute infection [42], others suggested long-term maintenance of IgM following clinical malaria [41,43].

In addition to IgM, cytophilic IgG subclasses can also work through complement fixation for some antigens and have been associated with protection against malaria [44,45]. In the present study, the two cytophilic antibody subclasses were present in 42.85% (IgG 1) and 36.13% (IgG 3) of the acutely infected subjects. In general, these antibodies may have a critical role in the development of premunition [46], and while their presence does not guarantee protection against clinical malaria, they may limit further complications [47].

When compared to other well-known *P. vivax* proteins from different phases of the parasite's life cycle, PvVir14 showed more frequent seroreactivity. It has been described that vir genes from different families might be profusely expressed in different isolates at non specified moments, unlike proteins such as PvDBP or PvCSP that are known to be expressed at a specific phase of the cycle [48]. The fact that those proteins are being expressed in an abundant

and constant way could be the reason why antibody levels are being detected in a higher frequency. Nevertheless, seroreactivity to *PvVir14* positively correlated with that to *PvCSP* (liver stage) and *PvDBP-RII* (blood-stage). Although the functional role of anti-*PvVir14* has yet to be defined, the prevalence of *PvVir14*-IgG is consistent with blood-stage parasite expression, which generally elicits a relatively greater antibody response [49,50].

Since *PvVir14* is a novel protein with features that suggest potential as a diagnostic or therapeutic target, we characterized immune cell subsets among acutely infected subjects with or without anti-*PvVir14* titers. Our results demonstrated an expanded population of atypical memory B (AtMBCs) lacking CD21 and CD27 expression. The presence of this subset has been extensively described in subjects known to be chronically infected with malaria and living in varied transmission settings [51,52]. In our study, the subjects comprising the *PvVir14* + group have a higher median of previous episodes (9.2 episodes/lifetime) than the subjects within the *PvVir14*- group (median: 7.8 episodes/lifetime), and such profile corroborates previous studies correlating AtMBC levels with past malaria infections [53]. Despite being a very common cell type among individuals exposed and/or infected with *Plasmodium*, this subset is also found in many other diseases, especially chronic ones such as HIV, hepatitis C (HBC), and lupus [54,55].

Whereas in broad terms AtMBCs are mainly defined by CD21<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>, the presence/absence of several other expression factors distinguish AtMBC and its functions [56]. During infection, expanded AtMBC numbers have been thought to imply an impaired B cell response [57,58]. However, recent research finds that atypical B cells are part of an alternative B cell lineage that is a normal feature in healthy immune responses [59], and this may explain our finding that *PvVir14* antibodies are related to an increase of AtMBCs. However, other studies suggested that a reduced expression of CD21 can be associated with complicated malaria [59,60], and thus may also be a feature of an impaired immune response.

When running a high dimensional analysis, classical and naïve B cells from the *PvVir14* + subjects showed a higher intensity of CD21 whilst those from *PvVir14*- subjects showed a higher intensity of CD27. Although the frequency of these B cell subsets did not differ between the groups, the differential intensity of these markers may suggest that the cells are functioning differently. We speculate these differences may also contribute to inter-individual differences in *PvVir14*-IgG production. While B cells and antibody responses have a key role in protection, immunity to vivax malaria has recently been linked to the presence and functionality of T cells [25]. Assuming the importance of T cells in generating long-lasting protection, we assessed T cell subsets among infected subjects with or without anti-*PvVir14* antibodies. We observed that CD4<sup>+</sup> cells are lower and CD8<sup>+</sup> cells are higher in *PvVir14*-IgG+ subjects compared to malaria-naïve healthy donors. A CD4<sup>+</sup> decrease is a common profile for *P. vivax*-infected individuals, potentially due to a propensity for apoptosis, loss of proliferative capacity, “exhaustion”, or redistribution to sites of inflammation [61–63]. Whereas CD8<sup>+</sup> T cells have not been thought to play a major immune role during blood-stage infection since red blood cells do not usually express human leucocyte antigen class I (HLA-I), it has been recently demonstrated that some reticulocytes (for which *P. vivax* has tropism) retain the protein translation machinery and surface-express these molecules [64,65]. In the same way as for B cells, *PvVir14*- subjects also demonstrated an upregulation of CD27 on both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, indicating perhaps a larger number of activated T cells within this group [66] albeit the reason remains to be investigated.

Since treatment can alter the dynamics of the immune response, we explored immune response after Chloroquine/Primaquine therapy. IgG titers decreased for all assessed subjects after 40 days and anti-*PvVir14* antibodies were still found circulating in the peripheral blood for most individuals (5/7 subjects) despite the marked reduction observed among the patients,

consistent with studies showing that *Plasmodium* infections induce a patent but short-lived antibody-responses to blood-stage antigens [67–70].

As for circulating immune cells, classical and naïve B, NK, and NKT cells presented a different profile when comparing acute and post-treatment scenarios. During acute infection, both naïve and classical clusters presented a higher CD27 intensity of expression when comparing groups with or without anti-*Pv*Vir14 titers, but it is yet to be defined if the difference in expression has an impact on the disease progression [71]. Although two out of four subjects showed a major decrease in NKT percentage of cells the difference was not significant except when assessing expression levels of these cells, in which intensity decreased markedly when comparing acute and treated patients. As for NK cells, the difference between pre and post treatment was highly significant, with a marked increase. While the upregulated profile is common for acute patients, this state is usually transient and has been described before [72–74]. Nonetheless, NK activation and response can vary widely, especially related to individual genetic profiles which can determine expression levels and mediation factors such as activation through cytokines [75,76], therefore, further investigation regarding the subjects' cytokine profile is warranted.

At the single B cell level, our study demonstrated that acute subjects present an unbalanced amount of *P. vivax*-IgM BCR versus other isotypes, indicating that those cells are probably engaged in the immune response to infection. Although predominance of IgM B cells has already been demonstrated for acute *P. falciparum* malaria subjects [77], little is known about the B cell biology of *P. vivax*. The IgM isotype has drawn attention lately since it can act as a protective factor through neutralization, opsonization, complement fixation, and functional inhibition of invasion with a higher and specific binding capacity [44,78]. At the gene level, we assessed the V region of the heavy chain segments known as V(D)J, which can undergo somatic hypermutation when challenged by an antigen [78], imbuing unique characteristics upon encounter with a particular pathogen. Among the genes unique to *P. vivax*-infected subjects, hIGHV3-23 was most common and accounted for 20% of all V gene usage within the heavy chain. The hIGHV3 family has already been related to high-affinity anti-*Plasmodium* antibodies against blood-stage antigens in naturally-infected subjects [79]. Of note, the hIGHV3-23 gene was recently identified as being present in children infected with *P. falciparum* for both *Pf*IgM<sup>+</sup> and *Pf*IgG<sup>+</sup>, but with a lower percentage of use [77]. Unlike the latter, in our study, even though we selected subjects with high titers of anti-*Pv*Vir14, the cell sorting was not performed using antigen to isolate *Pv*-specific B cells, and this is a limitation of our study, as well as the number of subjects selected for the experiments. However, by sorting all memory B cells from donors, we were able to fairly compare between malaria-immune and malaria-naïve donors.

Our findings provide the first characterization of naturally acquired antibody responses from three different malaria endemic regions against a *P. vivax* protein that we find is secreted in the urine of malaria patients. Further studies are warranted to understand the role of *Pv*Vir14 in infections, and its potential as a target of control tools to help reduce malaria around the globe.

### Supporting information

**S1 Fig. Gating strategy of B, T and NK cell subsets.** Cells were pre-gated for live/dead and then identified as follows: CD19<sup>+</sup> B cells, activated memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> (G1), Classical memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> (G2), Naïve B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup> (G4), Atypical memory B cells CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup> (G4), Live CD3<sup>+</sup>, NK cells (CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>), NKT cells (CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>). (TIFF)

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the State Laboratory of Pathology and Clinical Analysis (LEPAC); the Clinical Trial Research Team (CEPEM), both from Porto Velho, RO, Brazil, for field and laboratory assistance; the Malaria Research and Training Center (MRTC) clinical research team at the University of Sciences, Techniques and Technologies of Bamako (USTTB), Mali, for execution of the clinical study and sample collection; and Dr. Thomas Moyer and Dr. Calvin Eigsti from the Flow Cytometry Section (NIH/NIAID, Bethesda MD, United States of America) for laboratory assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Raianna F. Fantin, Camila H. Coelho, Anne D. Berhe, Dhélio B. Pereira, Nichole D. Salinas, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Data curation:** Raianna F. Fantin, Anne D. Berhe, Dhélio B. Pereira, Issaka Sagara, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Formal analysis:** Raianna F. Fantin, Camila H. Coelho, Anne D. Berhe, Luisa M. D. Magalhães, Dhélio B. Pereira, Nichole D. Salinas, Niraj H. Tolia, Chanaki Amaratunga, Seila Suon, David L. Narum, Ricardo T. Fujiwara, Claudia Abejon, Antonio Campos-Neto, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Funding acquisition:** Ricardo T. Fujiwara, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Investigation:** Raianna F. Fantin, Luisa M. D. Magalhães, Dhélio B. Pereira, Nichole D. Salinas, Niraj H. Tolia, Chanaki Amaratunga, Seila Suon, David L. Narum, Ricardo T. Fujiwara, Claudia Abejon, Antonio Campos-Neto, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Methodology:** Raianna F. Fantin, Anne D. Berhe, Luisa M. D. Magalhães, Dhélio B. Pereira, Nichole D. Salinas, Niraj H. Tolia, Chanaki Amaratunga, Seila Suon, David L. Narum, Ricardo T. Fujiwara, Claudia Abejon, Antonio Campos-Neto, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Project administration:** Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Resources:** Nichole D. Salinas, Niraj H. Tolia, Chanaki Amaratunga, Seila Suon, David L. Narum, Ricardo T. Fujiwara, Antonio Campos-Neto, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Supervision:** Camila H. Coelho, Issaka Sagara, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

**Validation:** Dhélio B. Pereira, Lilian L. Bueno.

**Visualization:** Lilian L. Bueno.

**Writing – original draft:** Raianna F. Fantin, Camila H. Coelho, Lilian L. Bueno.

**Writing – review & editing:** Raianna F. Fantin, Camila H. Coelho, Anne D. Berhe, Luisa M. D. Magalhães, Dhélio B. Pereira, Chanaki Amaratunga, Seila Suon, David L. Narum, Ricardo T. Fujiwara, Claudia Abejon, Antonio Campos-Neto, Patrick E. Duffy, Lilian L. Bueno.

## References

1. World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2020: years of global progress & challenges. 2020.
2. Ministério da Saúde do Brasil. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil.; 2022.

3. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. 2010; 9:13. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-13> PMID: 20070895
4. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 95(6 Suppl):15–34. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0141> PMID: 27402513
5. Reicht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. 2017; 16(1):273. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6> PMID: 28676055
6. Rahimi BA, Thakkinian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, Chokejindachai W. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malar J*. 2014; 13:481. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-481> PMID: 25486908
7. Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *J Vector Borne Dis*. 2018; 55(1):1–8.
8. Bozdech Z, Mok S, Hu G, Imwong M, Jaidee A, Russell B, et al. The transcriptome of *Plasmodium vivax* reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(42):16290–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807404105> PMID: 18852452
9. Price RN, Commons RJ, Battle KE, Thriemer K, Mendis K. *Plasmodium vivax* in the Era of the Shrinking *P. falciparum* Map. *Trends Parasitol*. 2020; 36(6):560–70. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.03.009> PMID: 32407682
10. Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med*. 2013; 19(2):168–78. <https://doi.org/10.1038/nm.3083> PMID: 23389617
11. Adams JH, Mueller I. The Biology of. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017; 7(9).
12. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. *Malaria. Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:17050. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50> PMID: 28770814
13. Duraisingh MT, Horn D. Epigenetic Regulation of Virulence Gene Expression in Parasitic Protozoa. *Cell Host Microbe*. 2016; 19(5):629–40. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.020> PMID: 27173931
14. Son UH, Dinzouna-Boutamba SD, Lee S, Yun HS, Kim JY, Joo SY, et al. Diversity of vir genes in *Plasmodium vivax* from endemic regions in the Republic of Korea: an initial evaluation. *Korean J Parasitol*. 2017; 55(2):149–58.
15. Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 2010; 202(4):638–47. <https://doi.org/10.1086/654815> PMID: 20617923
16. Requena P, Rui E, Padilla N, Martínez-Espinosa FE, Castellanos ME, Bötto-Menezes C, et al. *Plasmodium vivax* VIR Proteins Are Targets of Naturally-Acquired Antibody and T Cell Immune Responses to Malaria in Pregnant Women. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(10):e0005009. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005009> PMID: 27711158
17. Fantin RF, Abeijon C, Pereira DB, Fujiwara RT, Bueno LL, Campos-Neto A. Proteomic Analysis of Urine from Patients with. *Trop Med Infect Dis*. 2022; 7(10).
18. MacDonald NJ, Nguyen V, Shimp R, Reiter K, Herrera R, Burkhardt M, et al. Structural and Immunological Characterization of Recombinant 6-Cysteine Domains of the *Plasmodium falciparum* Sexual Stage Protein Pfs230. *J Biol Chem*. 2016; 291(38):19913–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732305> PMID: 27432885
19. Plassmeyer ML, Reiter K, Shimp RL, Kotova S, Smith PD, Hurt DE, et al. Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *J Biol Chem*. 2009; 284(39):26951–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013706> PMID: 19633296
20. Urusova D, Carias L, Huang Y, Nicolette VC, Popovici J, Roesch C, et al. Structural basis for neutralization of *Plasmodium vivax* by naturally acquired human antibodies that target DBP. *Nat Microbiol*. 2019; 4(9):1486–96. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0461-2> PMID: 31133752
21. Batchelor JD, Malpede BM, Omattage NS, DeKoster GT, Henzler-Wildman KA, Tolia NH. Red blood cell invasion by *Plasmodium vivax*: structural basis for DBP engagement of DARC. *PLoS Pathog*. 2014; 10(1):e1003869. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003869> PMID: 24415938
22. Tentokam BCN, Amaratunga C, Alani NAH, MacDonald NJ, Narum DL, Salinas ND, et al. Naturally Acquired Antibody Response to Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidate Pvs230 Domain 1. *Front Immunol*. 2019; 10:2295. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02295> PMID: 31636633
23. Chen H, Lau MC, Wong MT, Newell EW, Poidinger M, Chen J. Cytofkit: A Bioconductor Package for an Integrated Mass Cytometry Data Analysis Pipeline. *PLoS Comput Biol*. 2016; 12(9):e1005112. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005112> PMID: 27662185

24. Coelho CH, Tang WK, Burkhardt M, Galson JD, Muratova O, Salinas ND, et al. A human monoclonal antibody blocks malaria transmission and defines a highly conserved neutralizing epitope on gametes. *Nat Commun.* 2021; 12(1):1750. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21955-1> PMID: 33741942
25. Cozzarolo CS, Sironi N, Glaizot O, Pigeault R, Christophe P. Sex-biased parasitism in vector-borne disease: Vector preference? *PLoS One.* 2019; 14(5):e0216360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216360> PMID: 31048933
26. Dobaño C, Santano R, Vidal M, Jiménez A, Jairoce C, Ubillos I, et al. Differential Patterns of IgG Subclass Responses to. *Front Immunol.* 2019; 10:439.
27. Kurup SP, Butler NS, Harty JT. T cell-mediated immunity to malaria. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19(7):457–71. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0158-z> PMID: 30940932
28. Montes de Oca M, Good MF, McCarthy JS, Engwerda CR. The Impact of Established Immunoregulatory Networks on Vaccine Efficacy and the Development of Immunity to Malaria. *J Immunol.* 2016; 197(12):4518–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600619> PMID: 27913644
29. Soon MSF, Haque A. Recent Insights into CD4. *J Immunol.* 2018; 200(6):1965–75.
30. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology.* 2018; 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869> PMID: 30150991
31. Imkeller CK. Molecular characterization of public anti-PfCSP antibodies in human malaria. Germany: Heidelberg University; 2018.
32. De SL, Ntumngia FB, Nicholas J, Adams JH. Progress towards the development of a *P. vivax* vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2021:1–16. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1880896> PMID: 33481638
33. Tham WH, Beeson JG, Flayner JC. Plasmodium vivax vaccine research—we've only just begun. *Int J Parasitol.* 2017; 47(2–3):111–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.006> PMID: 27899329
34. Campos-Neto A, Abeijon C. Urine-Based Antigen (Protein) Detection Test for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Microorganisms.* 2020; 8(11).
35. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2008; 455(7214):757–63. <https://doi.org/10.1038/nature07327> PMID: 18843361
36. Secretaria de Vigilância Pública do Brasil. Dados para o cidadão 2021 [Available from: <https://public.tableau.com/profile/malaria.brasil>].
37. Chhim S, Piola P, Housen T, Herbreteau V, Tol B. Malaria in Cambodia: A Retrospective Analysis of a Changing Epidemiology 2006–2019. *Int J Environ Res Public Health.* 2021; 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph18041960> PMID: 33670471
38. White M, Watson J. Age, exposure and immunity. *Elife.* 2018; 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.40150> PMID: 30129437
39. Oliveira TR, Fernandez-Becerra C, Jimenez MC, Del Portillo HA, Soares IS. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. *Malar J.* 2006; 5:83. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-83> PMID: 17026752
40. Boyle MJ, Chan JA, Handayani I, Reiling L, Feng G, Hilton A, et al. IgM in human immunity to. *Sci Adv.* 2019; 5(9):eaax4489.
41. Maestre A, Muskus C, Duque V, Agudelo O, Liu P, Takagi A, et al. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for Duffy antigen receptor for chemokines (DARC). *PLoS One.* 2010; 5(7):e11437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011437> PMID: 20664684
42. Walker MR, Knudsen AS, Partey FD, Bassi MR, Frank AM, Castberg FC, et al. Acquisition and decay of IgM and IgG responses to merozoite antigens after *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. *PLoS One.* 2020; 15(12):e0243943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243943> PMID: 33332459
43. Krishnamurthy AT, Thouvenel CD, Portugal S, Keitany GJ, Kim KS, Holder A, et al. Somatic Hypermutated *Plasmodium*-Specific IgM(+) Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. *Immunity.* 2016; 45(2):402–14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.014> PMID: 27473412
44. Boyle MJ, Chan JA, Handayani I, Reiling L, Feng G, Hilton A, et al. IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci Adv.* 2019; 5(9):eaax4489.
45. Reiling L, Boyle MJ, White MT, Wilson DW, Feng G, Weaver R, et al. Targets of complement-fixing antibodies in protective immunity against malaria in children. *Nat Commun.* 2019; 10(1):610. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08528-z> PMID: 30723225
46. Soe S, Theisen M, Roussillon C, Aye KS, Druihe P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar.

- complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect Immun.* 2004; 72(1):247–52. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.247-252.2004> PMID: 14688102
47. Plewes K, Leopold SJ, Kingston HWF, Dondorp AM. Malaria: What's New in the Management of Malaria? *Infect Dis Clin North Am.* 2019; 33(1):39–60. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.002> PMID: 30712767
  48. Kar S, Sinha A. Plasmodium vivax Duffy Binding Protein-Based Vaccine: a Distant Dream. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2022; 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.916702> PMID: 35909975
  49. López C, Yepes-Pérez Y, Hincapié-Escobar N, Díaz-Arévalo D, Patarroyo MA. What Is Known about the Immune Response Induced by. *Front Immunol.* 2017; 8:126.
  50. Duffy PE, Patrick Gorres J. Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. *NPJ Vaccines.* 2020; 5(1):48. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0196-3> PMID: 32566259
  51. Requena P, Campo JJ, Umbers AJ, Ome M, Wangnapi R, Barrios D, et al. Pregnancy and malaria exposure are associated with changes in the B cell pool and in plasma eotaxin levels. *J Immunol.* 2014; 193(6):2971–83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401037> PMID: 25135831
  52. Portugal S, Tipton CM, Sohn H, Kone Y, Wang J, Li S, et al. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *Elife.* 2015; 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07218> PMID: 25955968
  53. Patgaonkar M, Herbert F, Powale K, Gandhe P, Gogtay N, Thatte U, et al. Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. *Parasite Immunol.* 2018; 40(10):e12580. <https://doi.org/10.1111/pim.12580> PMID: 30102786
  54. Holla P, Dizon B, Ambegaonkar AA, Rogel N, Goldschmidt E, Boddapati AK, et al. Shared transcriptional profiles of atypical B cells suggest common drivers of expansion and function in malaria, HIV, and autoimmunity. *Sci Adv.* 2021; 7(22). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg8384> PMID: 34039612
  55. Ubillos I, Campo JJ, Requena P, Ome-Kaius M, Hanieh S, Rose H, et al. Chronic Exposure to Malaria Is Associated with Inhibitory and Activation Markers on Atypical Memory B Cells and Marginal Zone-Like B Cells. *Front Immunol.* 2017; 8:966. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00966> PMID: 28878766
  56. Braddom AE, Batugedara G, Bol S, Bunnik EM. Potential functions of atypical memory B cells in Plasmodium-exposed individuals. *Int J Parasitol.* 2020; 50(13):1033–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.08.003> PMID: 32987039
  57. Silveira ELV, Dominguez MR, Soares IS. To B or Not to B: Understanding B Cell Responses in the Development of Malaria Infection. *Front Immunol.* 2018; 9:2961. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02961> PMID: 30619319
  58. Sundling C, Rönnerberg C, Yman V, Asghar M, Jahnmatz P, Lakshminathan T, et al. B cell profiling in malaria reveals expansion and remodelling of CD11c+ B cell subsets. *JCI Insight.* 2019; 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126492> PMID: 30939125
  59. Sutton HJ, Aye R, Idris AH, Vistein R, Nduati E, Kai O, et al. Atypical B cells are part of an alternative lineage of B cells that participates in responses to vaccination and infection in humans. *Cell Rep.* 2021; 34(6):108684. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108684> PMID: 33567273
  60. Korir JC, Magambo JK, Mwatha JK, Waitumbi JN. B-cell activity in children with malaria. *Malar J.* 2012; 11:66. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-66> PMID: 22405566
  61. Hojo-Souza NS, Pereira DB, Mendes TA, Passos LS, Gazzinelli-Guimarães AC, Gazzinelli-Guimarães PH, et al. CD4+ T cells apoptosis in Plasmodium vivax infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. *Malar J.* 2015; 14:5. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-14-5> PMID: 25559491
  62. Villegas-Mendez A, Khandelwal G, McGowan LM, Dookie RS, Haley MJ, George C, et al. Exhausted CD4. *J Immunol.* 2020; 205(6):1608–19.
  63. Spence PJ, Langhorne J. T cell control of malaria pathogenesis. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24(4):444–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.05.003> PMID: 22658628
  64. Hojo-Souza NS, Pereira DB, Passos LS, Gazzinelli-Guimarães PH, Cardoso MS, Tada MS, et al. Phenotypic profiling of CD8(+) T cells during Plasmodium vivax blood-stage infection. *BMC Infect Dis.* 2015; 15:35. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0762-x> PMID: 25636730
  65. Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M. Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol.* 2002; 168(11):5538–50. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5538> PMID: 12023349
  66. Hendriks J, Gravestien LA, Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, Borst J. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol.* 2000; 1(5):433–40. <https://doi.org/10.1038/80877> PMID: 11062504

67. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Costa HL, Torres LM, et al. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS One*. 2018; 13(11):e0207244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207244> PMID: 30419071
68. Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KK, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect Immun*. 2008; 76(4):1748–55. <https://doi.org/10.1128/IAI.01333-07> PMID: 18212081
69. Longley RJ, White MT, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Li Wai Suen CSN, et al. Naturally acquired antibody responses to more than 300 *Plasmodium vivax* proteins in three geographic regions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(9):e0005888. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005888> PMID: 28892517
70. Soares RR, Cunha CF, Ferraz-Nogueira R, Marins-Dos-Santos A, Rodrigues-da-Silva RN, da Silva Soares I, et al. Apical membrane protein 1-specific antibody profile and temporal changes in peripheral blood B-cell populations in *Plasmodium vivax* malaria. *Parasite Immunol*. 2019; 41(9):e12662. <https://doi.org/10.1111/pim.12662> PMID: 31271660
71. Ioannidis LJ, Pietrzak HM, Ly A, Utami RA, Eriksson EM, Studnberg SI, et al. High-dimensional mass cytometry identifies T cell and B cell signatures predicting reduced risk of *Plasmodium vivax* malaria. *JCI Insight*. 2021; 6(14). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148086> PMID: 34128836
72. Kim CC, Parikh S, Sun JC, Myrick A, Lanier LL, Rosenthal PJ, et al. Experimental malaria infection triggers early expansion of natural killer cells. *Infect Immun*. 2008; 76(12):5873–82. <https://doi.org/10.1128/IAI.00640-08> PMID: 18824529
73. Walk J, Sauerwein RW. Activatory Receptor NKp30 Predicts NK Cell Activation During Controlled Human Malaria Infection. *Front Immunol*. 2019; 10:2864. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02864> PMID: 31921133
74. Moebius J, Guha R, Peterson M, Abdi K, Skinner J, Li S, et al. PD-1 Expression on NK Cells in Malaria-Exposed Individuals Is Associated with Diminished Natural Cytotoxicity and Enhanced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Infect Immun*. 2020; 88(3). <https://doi.org/10.1128/IAI.00711-19> PMID: 31907195
75. Korbel DS, Newman KC, Almeida CR, Davis DM, Riley EM. Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2005; 175(11):7466–73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7466> PMID: 16301654
76. Wolf AS, Sherratt S, Riley EM. NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. *Front Immunol*. 2017; 8:212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00212> PMID: 28337195
77. Hopp CS, Sekar P, Diouf A, Miura K, Boswell K, Skinner J, et al. *Plasmodium falciparum*-specific IgM B cells dominate in children, expand with malaria, and produce functional IgM. *J Exp Med*. 2021; 218(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20200901> PMID: 33661303
78. Oyong DA, Wilson DW, Barber BE, William T, Jiang J, Galinski MR, et al. Induction and Kinetics of Complement-Fixing Antibodies Against *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 3 $\alpha$  and Relationship With Immunoglobulin G Subclasses and Immunoglobulin M. *J Infect Dis*. 2019; 220(12):1950–61.
79. Teng G, Papavasiliou FN. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet*. 2007; 41:107–20. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130340> PMID: 17576170

*CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO*

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

---

Este trabalho, que teve como principal objetivo a identificação, triagem e avaliação inicial de alvos imunogênicos para compor um protótipo vacinal contra a malária vivax, resultou na ampliação do repertório de possíveis novos candidatos. Dentre as principais descobertas, demonstramos que a abordagem *in silico* é uma importante ferramenta na identificação de bons alvos, e que antígenos peptídicos apresentam considerável capacidade imunogênica quando avaliados individualmente. De relevância, quando em síntese conjunta, essa resposta se demonstrou ainda mais robusta, o que vai de encontro ao princípio das vacinas multigênicas. Além disso, nossos achados forneceram a primeira caracterização de respostas de anticorpos naturalmente adquiridos contra uma nova proteína que descobrimos ser secretada na urina de pacientes com malária. A função de tal proteína nas infecções ainda precisa ser elucidada, mas sua imunogenicidade sugere um papel na fase sanguínea do ciclo do parasito, que costuma abarcar bons candidatos.

É nítido que as melhores formulações são aquelas que contemplam mais de um alvo, já que diferentes antígenos podem ativar diferentes vias de resposta imune que, quando em conjunto, têm maiores chances de provocar uma reação mais protetora, transcendente e eficaz. No entanto, a melhor combinação de antígenos, plataformas, e adjuvantes ainda não está clara. As vacinas que combinam mais de um antígeno demonstram resultados promissores, mas ainda estão em estágios iniciais e precisam ser avaliadas em estudos clínicos, que representam uma etapa fundamental para o entendimento dos mecanismos envolvidos. Ainda, a resposta imune a cada antígeno e seus componentes, bem como sua capacidade de ativar células imunes ou fixar complemento, também precisam ser elucidados, uma vez que a presença/ausência de títulos de anticorpos não indica, necessariamente, funcionalidade. Além disso, diferentes e novas plataformas como os vetores virais e o mRNA, precisam ser avaliadas e comparadas, já que recentemente tais tecnologias foram bem sucedidas no desenvolvimento de outras vacinas e ainda são pouco exploradas para este parasito.

Devido à grande lacuna de conhecimento sobre a biologia do *P. vivax*, nota-se um enorme atraso no desenvolvimento de medidas de controle para esta espécie, que é a mais abundantemente distribuída ao redor do globo e representa um grande ônus

para as populações afetadas. Por esses motivos, mais estudos e investimentos são imprescindíveis caso o mundo esteja realmente interessado em se ver livre da malária.

## 8. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The Biology of. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 7, n. 9, Sep 2017. ISSN 2157-1422. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28490540> >.

ADU, B. et al. Antibody levels against GLURP R2, MSP1 block 2 hybrid and AS202.11 and the risk of malaria in children living in hyperendemic (Burkina Faso) and hypoendemic (Ghana) areas. **Malar J**, v. 15, p. 123, Feb 27 2016. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921176> >.

AGNANDJI, S. T. et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. **N Engl J Med**, v. 367, n. 24, p. 2284-95, Dec 13 2012. ISSN 1533-4406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23136909> >.

ALEXANDRE, M. A. et al. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 10, p. 1611-4, Oct 2010. ISSN 1080-6059. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20875292> >.

AMINO, R. et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nat Med**, v. 12, n. 2, p. 220-4, Feb 2006. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429144> >.

ANTINORI, S. et al. Severe Plasmodium vivax malaria: fact or fiction? **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 11, p. 1581-3, Dec 2012. ISSN 1537-6591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911647> >.

ANTONELLI, L. R. et al. The immunology of Plasmodium vivax malaria. **Immunol Rev**, v. 293, n. 1, p. 163-189, 01 2020. ISSN 1600-065X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31642531> >.

AUBURN, S. et al. A new. **Wellcome Open Res**, v. 1, p. 4, Nov 15 2016. ISSN 2398-502X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28008421> >.

AURRECOECHEA, C. et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Database issue, p. D539-43, Jan 2009. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957442> >.

BAIA-DA-SILVA, D. C. et al. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, p. e20180542, Mar 07 2019. ISSN 1678-9849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30843971> >.

BARGIERI, D. Y. et al. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. **Nat Commun**, v. 4, p. 2552, 2013. ISSN 2041-1723. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108241> >.

BARUA, P. et al. The impact of early life exposure to Plasmodium falciparum on the development of naturally acquired immunity to malaria in young Malawian children. **Malar J**, v. 18, n. 1, p. 11, Jan 18 2019. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30658632> >.

BEESON, J. G.; OSIER, F. H.; ENGWERDA, C. R. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 12, p. 578-84, Dec 2008. ISSN 1471-4922. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848497> >.

BEZERRA, J. M. T. et al. Changes in malaria patterns in Brazil over 28 years (1990-2017): results from the Global Burden of Disease Study 2017. **Popul Health Metr**, v. 18, n. Suppl 1, p. 5, 09 30 2020. ISSN 1478-7954. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32993671> >.

BOWMAN, Z. S. et al. Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 2, p. 838-45, Aug 2005. ISSN 0022-3565. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840764> >.

BOYLE, M. J. et al. IgM in human immunity to. **Sci Adv**, v. 5, n. 9, p. eaax4489, 09 2019. ISSN 2375-2548. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31579826> >.

BOZDECH, Z. et al. The transcriptome of Plasmodium vivax reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 42, p. 16290-5, Oct 2008. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852452> >.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento de malária**: Secretária de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde do Brasil 2010.

BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**, v. 5, n. 10, p. e1038-e1046, 10 2017. ISSN 2214-109X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28867401> >.

BROWN, J.; GREENWOOD, B. M.; TERRY, R. J. Cellular mechanisms involved in recovery from acute malaria in Gambian children. **Parasite Immunol**, v. 8, n. 6, p. 551-64, Nov 1986. ISSN 0141-9838. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3543809> >.

BUENO, L. L. et al. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within Plasmodium vivax apical membrane antigen 1 (AMA-1). **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21289, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713006> >.

BUSCH, M. P. et al. Virus and antibody dynamics in acute west Nile virus infection. **J Infect Dis**, v. 198, n. 7, p. 984-93, Oct 01 2008. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18729783> >.

CAPPELLINI, M. D.; FIORELLI, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Lancet**, v. 371, n. 9606, p. 64-74, Jan 05 2008. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177777> >.

CARDOSO, M. A. et al. Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36341, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22574149> >.

CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathog Glob Health**, v. 113, n. 1, p. 1-13, 02 2019. ISSN 2047-7732. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30829565> >.

CARLTON, J. M. et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 757-63, Oct 2008. ISSN 1476-4687. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843361> >.

CASTRO, S. et al. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. **J Med Screen**, v. 13, n. 2, p. 85-6, 2006. ISSN 0969-1413. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792831> >.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Malaria. 2022. Available at: < <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> >. Accessed on: March 21nd.

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v. 192, p. 733-7, Nov 25 1961. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13880318> >.

CUTTS, J. C. et al. Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. **BMC Med**, v. 12, p. 150, Sep 09 2014. ISSN 1741-7015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25199532> >.

DA VEIGA, G. T. S. et al. vaccine: What is the best way to go? **Front Immunol**, v. 13, p. 910236, 2022. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36726991> >.

DAHER, A. et al. Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy and chloroquine with concomitant primaquine to treat *Plasmodium vivax* malaria in Brazil: an open label randomized clinical trial. **Malar J**, v. 17, n. 1, p. 45, Jan 24 2018. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29361939> >.

DE ALVARENGA, D. A. M. et al. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 86, 01 08 2018. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29311638> >.

DE LEMOS, A. B. et al. Reemergence of human malaria in Atlantic Forest of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 116, p. e210064, 2021. ISSN 1678-8060. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34259737> >.

DE NIZ, M. et al. gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. **Sci Adv**, v. 4, n. 5, p. eaat3775, 05 2018. ISSN 2375-2548. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29806032> >.

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. ISSN 1678-8060. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185003> >.

DEANS, J. A. et al. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of Plasmodium knowlesi. **Clin Exp Immunol**, v. 49, n. 2, p. 297-309, Aug 1982. ISSN 0009-9104. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6751636> >.

DEL PORTILLO, H. A. et al. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of Plasmodium vivax. **Nature**, v. 410, n. 6830, p. 839-42, Apr 12 2001. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298455> >.

DHOM-LEMONS, L. et al. Leishmania infantum recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0211719, 2019. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30703138> >.

DODOO, D. et al. Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. **Malar J**, v. 7, p. 142, Jul 29 2008. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664257> >.

DUFFY, P. E.; PATRICK GORRES, J. Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. **NPJ Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 48, Jun 09 2020. ISSN 2059-0105. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33580094> >.

FERNANDES, A. A. et al. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in the Brazilian Amazon region. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 4, p. 650-8, Apr 2008. ISSN 1556-679X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256207> >.

FERNANDEZ-BECERRA, C. et al. Variant proteins of Plasmodium vivax are not clonally expressed in natural infections. **Mol Microbiol**, v. 58, n. 3, p. 648-58, Nov 2005. ISSN 0950-382X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16238616> >.

\_\_\_\_\_. Plasmodium vivax and the importance of the subtelomeric multigene vir superfamily. **Trends Parasitol**, v. 25, n. 1, p. 44-51, Jan 2009. ISSN 1471-4922. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19036639> >.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 11, p. 744-57, Nov 2014. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324127> >.

GERBERDING, J. L. The new vaccine frontier. **S D Med**, v. Spec no, p. 123-6, 2013. ISSN 0038-3317. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23444603> >.

GOMES, E. C. S. et al. Outbreak of autochthonous cases of malaria in coastal regions of Northeast Brazil: the diversity and spatial distribution of species of Anopheles. **Parasit Vectors**, v. 13, n. 1, p. 621, Dec 14 2020. ISSN 1756-3305. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33317632> >.

GONZALES, S. J. et al. Naturally Acquired Humoral Immunity Against. **Front Immunol**, v. 11, p. 594653, 2020. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33193447> >.

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. ISSN 1549-1676. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18092885> >.

GRUSZCZYK, J. et al. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 48-55, 01 05 2018. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29302006> >.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010. ISSN 1740-1534. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079655> >.

HERRERA, S. et al. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 13-14, p. 1535-46, Dec 2004. ISSN 0020-7519. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582530> >.

HERRINGTON, D. A. et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium falciparum sporozoites. **Nature**, v. 328, n. 6127, p. 257-9, 1987 Jul 16-22 1987. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2439920> >.

HOWES, R. E. et al. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. **Adv Parasitol**, v. 81, p. 133-201, 2013. ISSN 2163-6079. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384623> >.

IRANI, V. et al. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. **Mol Immunol**, v. 67, n. 2 Pt A, p. 171-82, Oct 2015. ISSN 1872-9142. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25900877> >.

JANSSEN, C. S. et al. Plasmodium interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 19, p. 5712-20, 2004. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507685> >.

JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 9, p. 573-87, Sep 2015. ISSN 1740-1534. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26272409> >.

KIM, S. et al. Performance of the CareStart™ G6PD deficiency screening test, a point-of-care diagnostic for primaquine therapy screening. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28357, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22164279> >.

KOCHAR, D. K. et al. Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 2, p. 194-8, Feb 2009. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190212> >.

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, 08 2016. ISSN 1097-4180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27473412> >.

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. ISSN 0035-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3922096> >.

LARSEN, J. E.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Res**, v. 2, p. 2, Apr 24 2006. ISSN 1745-7580. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635264> >.

LAURENS, M. B. et al. Strain-specific Plasmodium falciparum growth inhibition among Malian children immunized with a blood-stage malaria vaccine. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173294, 2017. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28282396> >.

LEY, B. et al. The challenges of introducing routine G6PD testing into radical cure: a workshop report. **Malar J**, v. 14, p. 377, Sep 29 2015. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26416229> >.

\_\_\_\_\_. Performance of the Access Bio/CareStart rapid diagnostic test for the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Med**, v. 16, n. 12, p. e1002992, 12 2019. ISSN 1549-1676. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31834890> >.

LONGLEY, R. J. et al. Naturally acquired antibody responses to more than 300 Plasmodium vivax proteins in three geographic regions. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 9, p. e0005888, Sep 2017. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28892517> >.

LOUBENS, M. et al. Plasmodium sporozoites on the move: Switching from cell traversal to productive invasion of hepatocytes. **Mol Microbiol**, v. 115, n. 5, p. 870-881, May 2021. ISSN 1365-2958. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33191548> >.

LÓPEZ, C. et al. What Is Known about the Immune Response Induced by. **Front Immunol**, v. 8, p. 126, 2017. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243235> >.

MACDONALD, A. J.; MORDECAI, E. A. Amazon deforestation drives malaria transmission, and malaria burden reduces forest clearing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 116, n. 44, p. 22212-22218, 10 29 2019. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31611369> >.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-65, 2009. ISSN 0732-0582. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302040> >.

MEDICA, D. L.; SINNIS, P. Quantitative dynamics of Plasmodium yoelii sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 4363-9, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972531> >.

MELO, J. O. et al. Evaluation of the malaria elimination policy in Brazil: a systematic review and epidemiological analysis study. **Trop Biomed**, v. 37, n. 2, p. 513-535, Jun 2020. ISSN 2521-9855. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33235398> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância Pública. Guia de Tratamento da Malária no Brasil. p. 83, 2021.

MIURA, K. et al. Anti-apical-membrane-antigen-1 antibody is more effective than anti-42-kilodalton-merozoite-surface-protein-1 antibody in inhibiting plasmodium falciparum growth, as determined by the in vitro growth inhibition assay. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 7, p. 963-8, Jul 2009. ISSN 1556-679X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439523> >.

MOLINA-FRANKY, J. et al. Plasmodium falciparum pre-erythrocytic stage vaccine development. **Malar J**, v. 19, n. 1, p. 56, Feb 03 2020. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32013956> >.

MORENO-PÉREZ, D. A. et al. Determining the Plasmodium vivax VCG-1 strain blood stage proteome. **J Proteomics**, v. 113, p. 268-280, 01 15 2015. ISSN 1876-7737. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316051> >.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells: the first steps of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. **Cell Microbiol**, v. 6, n. 12, p. 1113-8, Dec 2004. ISSN 1462-5814. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15527491> >.

MUELLER, I. et al. Natural acquisition of immunity to Plasmodium vivax: epidemiological observations and potential targets. **Adv Parasitol**, v. 81, p. 77-131, 2013. ISSN 2163-6079. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384622> >.

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. ISSN 1873-2518. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26428453> >.

NAIR, M. et al. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (AMA1). **J Mol Biol**, v. 322, n. 4, p. 741-53, Sep 27 2002. ISSN 0022-2836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270711> >.

NTUMNGIA, F. B. et al. The role of the human Duffy antigen receptor for chemokines in malaria susceptibility: current opinions and future treatment prospects. **J Receptor Ligand Channel Res**, v. 9, p. 1-11, 2016. ISSN 1178-699X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28943755> >.

NUSSENZWEIG, R. S. et al. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. **Nature**, v. 216, n. 5111, p. 160-2, Oct 14 1967. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6057225> >.

O'NEILL, L. A.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 6, p. 453-60, 06 2013. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681101> >.

OCKENHOUSE, C. F. et al. Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. **J Infect Dis**, v. 164, n. 1, p. 163-9, Jul 1991. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1711552> >.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malar J**, v. 9, p. 115, Apr 30 2010. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433744> >.

LOTU, A. et al. Advancing Global Health through Development and Clinical Trials Partnerships: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Assessment of Safety, Tolerability, and Immunogenicity of PfSPZ Vaccine for Malaria in Healthy Equatoguinean Men. **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, n. 1, p. 308-318, 01 2018. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29141739> >.

ORGANIZATION, W. H. **World malaria report 2020: years of global progress & challenges**. Geneva, p.299. 2020

\_\_\_\_\_. **Proposed framework for policy decision on RTS,S/AS01 malaria vaccine**: 55 p. 2021.

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report 2022**. Geneva, p.372. 2022

PATARROYO, M. E. et al. Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically synthesized anti-malarial vaccines. **J Cell Mol Med**, v. 12, n. 5B, p. 1915-35, Oct 2008. ISSN 1582-1838. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19012725> >.

PEARSON, M. S. et al. Neutralizing antibodies to the hookworm hemoglobinase Na-APR-1: implications for a multivalent vaccine against hookworm infection and schistosomiasis. **J Infect Dis**, v. 201, n. 10, p. 1561-9, May 15 2010. ISSN 1537-6613. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20367477> >.

PENNY, M. et al. Public health impact and cost-effectiveness of the RTS,S/AS01 malaria vaccine: a systematic comparison of predictions from four mathematical models. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 367-375, 2016.

PETTER, M.; DUFFY, M. F. Antigenic Variation in Plasmodium falciparum. **Results Probl Cell Differ**, v. 57, p. 47-90, 2015. ISSN 0080-1844. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26537377> >.

PIZARRO, J. C. et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 408-11, Apr 15 2005. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731407> >.

PLEASS, R. J. et al. Immunoglobulin M: Restrainer of Inflammation and Mediator of Immune Evasion by Plasmodium falciparum Malaria. **Trends Parasitol**, v. 32, n. 2, p. 108-119, Feb 2016. ISSN 1471-5007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597020> >.

PLEWES, K. et al. Malaria: What's New in the Management of Malaria? **Infect Dis Clin North Am**, v. 33, n. 1, p. 39-60, 03 2019. ISSN 1557-9824. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30712767> >.

POLLEY, S. D. et al. Human antibodies to recombinant protein constructs of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. **Vaccine**, v. 23, n. 5, p. 718-28, Dec 16 2004. ISSN 0264-410X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542195> >.

PREVENTION, C. F. D. C. A. Treatment of Malaria: Guidelines for Clinicians 2023. Available at: < [https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/clinicians1.html](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/clinicians1.html) >. Accessed on: March 21nd.

PRICE, R. N. et al. Plasmodium vivax in the Era of the Shrinking P. falciparum Map. **Trends Parasitol**, v. 36, n. 6, p. 560-570, 06 2020. ISSN 1471-5007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32407682> >.

RAHIMI, B. A. et al. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malar J**, v. 13, p. 481, Dec 2014. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25486908> >.

RAY, S. et al. Clinicopathological Analysis and Multipronged Quantitative Proteomics Reveal Oxidative Stress and Cytoskeletal Proteins as Possible Markers for Severe Vivax Malaria. **Sci Rep**, v. 6, p. 24557, Apr 19 2016. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090372> >.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malar J**, v. 16, n. 1, p. 273, 07 2017. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28676055> >.

REMARQUE, E. J. et al. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 2, p. 74-84, Feb 2008. ISSN 1471-4922. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226584> >.

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. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25135831> >.

\_\_\_\_\_. Plasmodium vivax VIR Proteins Are Targets of Naturally-Acquired Antibody and T Cell Immune Responses to Malaria in Pregnant Women. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 10, p. e0005009, Oct 2016. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27711158> >.

RICHARDS, J. S. et al. Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of Plasmodium falciparum and protection from malaria and high-density parasitemia. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 8, p. e50-60, Oct 15 2010. ISSN 1537-6591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843207> >.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nat Med**, v. 19, n. 2, p. 168-78, Feb 2013. ISSN 1546-170X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389617> >.

RISCO-CASTILLO, V. et al. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. **Cell Host Microbe**, v. 18, n. 5, p. 593-603, Nov 11 2015. ISSN 1934-6069. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607162> >.

ROJAS-PEÑA, M. L. et al. Transcription Profiling of Malaria-Naïve and Semi-immune Colombian Volunteers in a Plasmodium vivax Sporozoite Challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 8, p. e0003978, 2015. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26244760> >.

ROSALIA, R. A. et al. Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 10, p. 2554-65, Oct 2013. ISSN 1521-4141. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836147> >.

ROSER, M.; RITCHIE, H. **Malaria**. Published online at OurWorldInData.org 2019.

ROWE, J. A. et al. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, p. e16, May 26 2009. ISSN 1462-3994. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467172> >.

RTS, S. Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase

3, individually randomised, controlled trial. **Lancet**, v. 386, n. 9988, p. 31-45, Jul 04 2015. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25913272> >.

SAAD, S. T. et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. **Hum Hered**, v. 47, n. 1, p. 17-21, 1997 Jan-Feb 1997. ISSN 0001-5652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9017974> >.

SALAVATIFAR, M. et al. High-Level Expression, Purification and Characterization of A Recombinant Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1: Implication for vivax Malaria Vaccine Development. **Cell J**, v. 17, n. 3, p. 520-31, 2015. ISSN 2228-5806. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464824> >.

SALGADO-MEJIAS, P. et al. Structure of Rhoptry Neck Protein 2 is essential for the interaction in vitro with Apical Membrane Antigen 1 in Plasmodium vivax. **Malar J**, v. 18, n. 1, p. 25, Jan 25 2019. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30683104> >.

SALINAS, N. D.; TANG, W. K.; TOLIA, N. H. Blood-Stage Malaria Parasite Antigens: Structure, Function, and Vaccine Potential. **J Mol Biol**, v. 431, n. 21, p. 4259-4280, 10 04 2019. ISSN 1089-8638. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31103771> >.

SANTANA, M. S. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in an endemic area for malaria in Manaus: a cross-sectional survey in the Brazilian Amazon. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5259, 2009. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19370159> >.

SANTIAGO, H. C. et al. Structural and immunologic cross-reactivity among filarial and mite tropomyosin: implications for the hygiene hypothesis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 2, p. 479-86, Feb 2011. ISSN 1097-6825. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21185070> >.

SATTERTHWAIT, A. C. et al. The conformational restriction of synthetic vaccines for malaria. **Bull World Health Organ**, v. 68 Suppl, p. 17-25, 1990. ISSN 0042-9686. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2094582> >.

SAÚDE, S. D. V. E.; BRASIL, M. D. S. D. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM**. Brasília: Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária 2003.

\_\_\_\_\_. **Boletim Epidemiológico: Malária**: 117 p. 2020.

SEOH, J. Y. et al. Serum cytokine profiles in patients with Plasmodium vivax malaria: a comparison between those who presented with and without hyperpyrexia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 1, p. 102-6, Jan 2003. ISSN 0002-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556157> >.

SETH, R. K. et al. Acquired immune response to defined Plasmodium vivax antigens in individuals residing in northern India. **Microbes Infect**, v. 12, n. 3, p. 199-206, Mar

2010. ISSN 1769-714X. Available at: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034587> >.

SILVIE, O. et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J Biol Chem**, v. 279, n. 10, p. 9490-6, Mar 05 2004. ISSN 0021-9258. Available at: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676185> >.

SINGH, V.; GUPTA, P.; PANDE, V. Revisiting the multigene families: *Plasmodium* var and vir genes. **J Vector Borne Dis**, v. 51, n. 2, p. 75-81, Jun 2014. ISSN 0972-9062. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947212> >.

SIQUEIRA, A. M. et al. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87-96, Dec 28 2016. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27708190> >.

SKWARCZYNSKI, M. et al. Progress in the Development of Subunit Vaccines against Malaria. **Vaccines (Basel)**, v. 8, n. 3, Jul 10 2020. ISSN 2076-393X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32664421> >.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 3, p. 169-80, Mar 2004. ISSN 1474-1733. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039754> >.

STOWERS, A. W. et al. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 6961-7, Dec 2002. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438375> >.

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. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888102> >.

TALAPKO, J. et al. Malaria: The Past and the Present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, Jun 21 2019. ISSN 2076-2607. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31234443> >.

THAM, W. H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. *Plasmodium vivax* vaccine research - we've only just begun. **Int J Parasitol**, v. 47, n. 2-3, p. 111-118, 02 2017. ISSN 1879-0135. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899329> >.

TOMARAS, G. D. et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. **J Virol**, v. 82, n. 24, p. 12449-63, Dec 2008. ISSN 1098-5514. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18842730> >.

URUSOVA, D. et al. Structural basis for neutralization of *Plasmodium vivax* by naturally acquired human antibodies that target DBP. **Nat Microbiol**, v. 4, n. 9, p. 1486-

1496, 09 2019. ISSN 2058-5276. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31133752> >.

VANBUSKIRK, K. M. et al. Antigenic drift in the ligand domain of Plasmodium vivax duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. **J Infect Dis**, v. 190, n. 9, p. 1556-62, Nov 01 2004. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15478059> >.

VARO, R.; CHACCOUR, C.; BASSAT, Q. Update on malaria. **Med Clin (Barc)**, v. 155, n. 9, p. 395-402, 11 13 2020. ISSN 1578-8989. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32620355> >.

VILLAMIL GÓMEZ, W. E.; ESCALANTE, M. E.; FRANCO-PAREDES, C. Severe and Complicated Malaria due to *Plasmodium vivax* In: INTECHOPEN (Ed.). **Current Topics in Malaria**, 2016.

WANGDI, K. et al. Comparative effectiveness of malaria prevention measures: a systematic review and network meta-analysis. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 1, p. 210, 03 27 2018. ISSN 1756-3305. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29587882> >.

WATSON, J. et al. Modelling primaquine-induced haemolysis in G6PD deficiency. **Elife**, v. 6, 02 04 2017. ISSN 2050-084X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28155819> >.

WEISS, G. E. et al. Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 2, p. e1004670, Feb 2015. ISSN 1553-7374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25723550> >.

WICKRAMARACHCHI, T. et al. Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 2, p. 199-208, Feb 2007. ISSN 0020-7519. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055511> >.

WINTER, G. et al. SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes. **J Exp Med**, v. 201, n. 11, p. 1853-63, Jun 06 2005. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939796> >.

WU, Y. et al. Development of malaria transmission-blocking vaccines: from concept to product. **Adv Parasitol**, v. 89, p. 109-52, Jun 2015. ISSN 2163-6079. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003037> >.

WYKES, M. N.; GOOD, M. F. What really happens to dendritic cells during malaria? **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 11, p. 864-70, Nov 2008. ISSN 1740-1534. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18711429> >.

## 9. ANEXOS

Questionário individual de anamnese para pacientes diagnosticados com malária vivax ou falciparum no Centro de Medicina Tropical (CEPEM) – Porto Velho, Rondônia.

### AVALIAÇÃO DE RESPOSTA IMUNE DE PACIENTES INFECTADOS POR *PLASMODIUM* ATENDIDOS NAS UNIDADES DE DIAGNÓSTICO E NOTIFICAÇÃO DE MALÁRIA

#### QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

	Código não preencher
<u>Nome:</u>	
<u>Número da lâmina:</u>	
<u>Idade</u> [Escreva a idade em anos completados, referida pelo entrevistado] _____ anos	
<u>Sexo</u> [Marque com um X a quadrícula correspondente ao sexo]	<input type="checkbox"/> Masc <input type="checkbox"/> Fem
<u>Cor</u> [Marque na quadrícula correspondente a cor do entrevistado]	<input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Morena <input type="checkbox"/> Amarela <input type="checkbox"/> Preta
<u>Estado Civil</u> [Marque com um X a quadrícula ao lado que corresponde ao estado civil respondido pelo entrevistado.]	<input type="checkbox"/> Solteiro <input type="checkbox"/> Casado <input type="checkbox"/> Viúvo <input type="checkbox"/> Separado <input type="checkbox"/> Amasiado
<u>Ocupação Principal</u> [Marque na quadrícula ao lado a principal ocupação do entrevistado na localidade do estudo. Caso a resposta se enquadre em Outra ocupação, especificar no espaço reservado]	<input type="checkbox"/> Dona de casa <input type="checkbox"/> Lavrador <input type="checkbox"/> Cozinheiro(a)/Doméstica <input type="checkbox"/> Caminhoneiro <input type="checkbox"/> Vendedor/Comerciante <input type="checkbox"/> Menor (sem trabalho) <input type="checkbox"/> Outra (especificar) _____
<u>Estado de nascimento:</u> [Escreva a sigla da Unidade da Federação em que o entrevistado nasceu]	<input type="checkbox"/> Não sabe
<u>História migracional</u> [Escreva no espaço ao lado a seqüência das siglas das Unidades da Federação em que residiu o entrevistado]	_____
<u>Local de residência</u> [Marque na quadrícula ao lado o local onde o indivíduo passa a maior parte das noites, durante a semana]	<input type="checkbox"/> Na área urbana <input type="checkbox"/> Em área rural <input type="checkbox"/> Em outro município <input type="checkbox"/> Não sabe
<u>Há quanto tempo exerce a atividade profissional neste município?</u> [Escreva no espaço ao lado o tempo que o entrevistado exerce a atividade no município do estudo. Se não tem ocupação respondida anteriormente, marque Não se Aplica]	_____ anos _____ meses <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> Não sabe
<u>Há quanto tempo reside em área que tem transmissão de malária?</u> [Escreva no espaço ao lado o tempo que o entrevistado reside na área endêmica de malária. Área endêmica no Brasil equivale a todos os estados da Amazônia Legal]	___ anos ___ meses ___ dias <input type="checkbox"/> Não sabe
<u>Depois que você se mudou para a área de malária, você voltou a sair dela, para outro local que não dá malária? Se sim, por quanto tempo viveu fora?</u> [Escreva no espaço ao lado a resposta e o tempo que o entrevistado viveu fora área endêmica de malária, após ter vivido nela]	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO _____ anos ___ meses ___ dias
<u>Nos últimos 30 dias você usou algum método para se prevenir das picadas de insetos?</u> [Marque a quadrícula correspondente à resposta do entrevistado. Liste para ele os métodos: repelentes, mosquiteiro, alho, vitamina B, etc.]	<input type="checkbox"/> SIM, todos os dias ou quase todos os dias <input type="checkbox"/> SIM, apenas quando tem mais mosquito <input type="checkbox"/> NÃO USOU
<u>Nos últimos 30 dias você usou algum método para evitar ficar doente por malária?</u> [Marque a quadrícula correspondente à resposta do entrevistado. Remédios, produtos caseiros, etc.]	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
<u>Que idade você tinha quando teve a sua primeira malária?</u> [Marque no espaço ao lado a resposta do entrevistado.]	_____ anos

<p><u>Quantas malárias você já teve?</u> [Escreva no espaço ao lado o número de malária referida pelo entrevistado. Caso ele não precise o número, descreva a faixa que seja mais adequada. Mesmo que ele suspeite de ser a mesma malária que recrudescer/recaiu, registre sempre a quantidade que ele referir. Se nunca teve malária, preencha com 0]</p>	<input type="checkbox"/> 5 a 10 <input type="checkbox"/> 11 a 20 <input type="checkbox"/> 20 a 50 <input type="checkbox"/> 50 ou mais <input type="checkbox"/> Não sabe	
<p><u>Há quanto tempo (dias, meses ou anos) você teve a sua última malária?</u> [Anotar, no espaço ao lado, o tempo referido pelo paciente. Atenção, não esquecer da unidade: dias, meses ou anos. Caso não seja exato, registre o tempo aproximado]</p>	<p>____ dias ____ meses ____ anos</p> <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> Não sabe	
<p><u>Qual foi a espécie de sua última malária?</u> [Marque a quadrícula correspondente à espécie referida pelo entrevistado]</p>	<input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> Mista <input type="checkbox"/> Não sabe <input type="checkbox"/> Não se aplica	
<p><u>Em relação a todas as malárias que você já sofreu, quais foram as espécies diagnosticadas</u> [Marque a quadrícula correspondente à espécie referida pelo entrevistado]</p>	<input type="checkbox"/> Só <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> Só <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> Já teve as duas <input type="checkbox"/> Não sabe <input type="checkbox"/> Não se aplica	
<p><u>Quantos dias você não pode fazer as suas atividades normais, por causa desta malária?</u> [Deixar de trabalhar, estudar, etc. Marque ao lado. Se não parou nenhum dia, marque 0]</p>	<p>____ (dias)</p> <input type="checkbox"/> Não sabe <input type="checkbox"/> Não se aplica	
<p><u>Quantas vezes necessitou internar em hospital, para tratar malária?</u> [Caso nunca tenha se internado, marque 0. Se nunca teve malária, marque Não se aplica]</p>	<input type="checkbox"/> Não sabe <input type="checkbox"/> Não se aplica	
<p><u>Você tem algum problema de saúde?</u> [Marque na quadrícula ao lado e se a resposta for SIM, especifique o problema relatado pelo paciente]</p>	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <p>_____</p>	
<p>• <u>Qual(is) dos sintomas ao lado está (ão) incomodando você?</u> [Leia para o entrevistado a lista ao lado e marque a(s) quadrícula(s) correspondente(s) ao(s) sintoma(s) que ele referir como SIM. Caso a resposta seja "Outro", especificar no espaço reservado]</p>	<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Dor de cabeça <input type="checkbox"/> Dor no corpo <input type="checkbox"/> Dor epigástrica <input type="checkbox"/> Tonteira <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Vômitos <input type="checkbox"/> Fraqueza <input type="checkbox"/> Frio <input type="checkbox"/> Outro: <p>_____</p> <input type="checkbox"/> Não sabe <input type="checkbox"/> Não se aplica	
<b>Os dados abaixo serão anotados pelo investigador principal</b>		
<p><u>Resultado da lâmina da primeira visita:</u></p>	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não realizado/Ignorado	
<p><u>Espécie do parasita, dos casos positivos, pela gota espessa:</u></p>	<input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> Mista <input type="checkbox"/> Gametócito <input type="checkbox"/> Não se aplica	

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes diagnosticados com malária vivax ou falciparum no Centro de Medicina Tropical (CEPEM) – Porto Velho, Rondônia.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“ASPECTOS DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA NA INFECÇÃO POR *Plasmodium vivax*”**. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano **sangue, células mononucleares do sangue periférico (Imunofenotipagem por citometria de fluxo), DNA e RNA (expressão de componentes da via de sinalização celular), plasma (ELISA) e urina (teste rápido), além da utilização dos seus dados clínicos. Além disso, solicitar aos pacientes autorização para a utilização de seus dados clínicos e/ou epidemiológicos, assim como daqueles gerados pelo questionário.** A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos **a avaliar a resposta imunológica de pacientes com malária e avaliar a eficácia de um teste rápido para diagnosticar a doença.** Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: “As amostras de sangue (40 mL) serão coletadas por profissionais experientes, posteriormente a coleta, serão separados em laboratório o soro, DNA e células mononucleares. Caso você aceite participar, serão coletadas duas amostras de sangue, utilizando materiais individuais e estéreis: uma antes do tratamento e outra após o tratamento com medicamento. Além disso, será coletada a primeira urina (30 mL) da manhã para avaliar a eficácia de um método de diagnóstico rápido. Todas as amostras serão armazenadas em freezer -20°C e -80°C até o final da pesquisa. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em leve desconforto da picada da agulha durante a coleta do sangue e, possivelmente, desenvolvimento de equimose, entretanto, não existirão risco para a sua saúde. Entretanto, as amostras serão coletadas por profissionais qualificados que estarão aptos a auxiliar em qualquer contratempo. A pesquisa contribuirá para entender sobre a resposta imunológica em indivíduos com da doença e, possivelmente, auxiliará na confecção de um teste de diagnóstico rápido.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos**, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos na sala 167/E4 do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“ASPECTOS DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA NA INFECÇÃO POR *Plasmodium vivax*”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

- ( ) Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.  
 ( ) Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do participante \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

---

Assinatura do participante

**Nome completo do Pesquisador Responsável:**

Ricardo Toshio Fujiwara  
 Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, Instituto de Ciências Biológicas, Sala 167/E4 Campus Pampulha.  
 CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG  
 Telefones: (31) 3409-2871  
 E-mail: fujiwara@icb.ufmg.br

---

Assinatura do pesquisador responsável \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

**Nome completo do Pesquisador:**

Raianna Farhat Fantin  
 Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, Instituto de Ciências Biológicas, Sala 167/E4 Campus Pampulha.  
 CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG  
 Telefones: (31) 3409-2871  
 E-mail: farhat@outlook.com.br

---

Assinatura do pesquisador (mestrando ou doutorando) \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**  
 Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.  
 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.  
 E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.