

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

GABRIELA MAIA FERNANDES

**Novo alvo potencial para vacinas contra *Plasmodium vivax*: estudo da
variabilidade genética de uma nova proteína de formas sanguíneas**

Belo Horizonte – MG
Setembro de 2023

GABRIELA MAIA FERNANDES

**Novo alvo potencial para vacinas contra *Plasmodium vivax*: estudo da
variabilidade genética de uma nova proteína de formas sanguíneas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Dra. Luzia Helena Carvalho
Coorientadora: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Belo Horizonte – MG
Setembro de 2023

043

Fernandes, Gabriela Maia.

Novo alvo potencial para vacinas contra *Plasmodium vivax*: estudo da variabilidade genética de uma nova proteína de formas sanguíneas [manuscrito] / Gabriela Maia Fernandes. – 2023.

118 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Luzia Helena Carvalho. Coorientadora: Dra. Taís Nóbrega de Sousa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Malária. 3. *Plasmodium vivax*. 4. Vacinas. 5. Variação Genética. I. Carvalho, Luzia Helena. II. Sousa, Taís Nóbrega de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

GABRIELA MAIA FERNANDES - 462/2023/17

ENTRADA 2º/2021 - MATRICULA: 2021705859

Às **14:00** horas do dia **dezesseis de outubro de 2023**, ICB - Bloco E3/Sala 164 - em formato híbrido, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Gabriela Maia Fernandes**. A presidência da sessão coube a **Professora Luzia Helena Carvalho**, orientadora. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora constituída pelos doutores: **Irene da Silva Soares** - USP, **Élida Mara Leite Rabelo** - UFMG, **Thaís Nobrega de Sousa**, IRR/FIOCRUZ e **Luzia Helena Carvalho**, IRR/FIOCRUZ, orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**NOVO ALVO POTENCIAL PARA VACINAS CONTRA Plasmodium vivax: ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA NOVA PROTEÍNA DE FORMAS SANGUÍNEAS**", área de **concentração: Protozoologia**. Seguiu-se a arguição pelas examinadoras e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **aprovada** a **Dissertação de Mestrado**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de outubro de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Luzia Helena Carvalho, Usuária Externa**, em



17/10/2023, às 14:38, 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 **Elida Mara Leite Rabelo, Vice diretor(a)**, em 18/10/2023, às 11:11, 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 **Irene da Silva Soares, Usuário Externo**, em 18/10/2023, às 15:21, 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, informando o código verificador **2627887** e o código CRC **51B78C86**.

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária, do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, sob a orientação da Dra. Luzia Helena Carvalho e coorientação da Dra. Taís Nóbrega de Sousa. Este estudo foi financiado pelo *National Institutes of Health* (NIH) (Grant NIH # R01 AI064478-12A1), Programa Inova da Fiocruz (8571634294); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-02625-15 e APQ-01580-18) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (312299/2021-4). Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas (nº 4.041.859 e CAAE 15632719.0.0000.5091) e registrado no SisGen: AEE3CF9. O presente trabalho foi realizado com bolsa de pós-graduação concedida ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG pelo CNPq.

Aos meus pais, Rosângela Maia e Marcos Antônio,
pelo incentivo, amor, carinho, por sempre apoiarem
minhas escolhas profissionais e serem meu porto
seguro.

Ao meu irmão, Marcos Paulo, pela cumplicidade,
amizade, carinho, amor e por me alegrar nos
momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Luzia Helena, pela orientação e ensinamentos, por transmitir um entusiasmo pela ciência fundamental para o meu desenvolvimento como profissional, por todas as contribuições intelectuais durante os seminários, reuniões e conversas. É uma honra poder trabalhar e aprender com você diariamente.

À Dra. Taís, pela coorientação e contribuição em toda a minha jornada, por me ajudar a solucionar os problemas com muito carinho e disposição.

À Dra. Flora e à Dra. Cristiana, pelos ensinamentos durante os seminários e as conversas no corredor, por estarem sempre abertas e dispostas a ajudar.

À Dra. Letícia Torres, minha coorientadora durante a iniciação científica, pelas conversas, discussões e ensinamentos.

Ao Guilherme Henrique, aluno de iniciação científica, pelo apoio, companheirismo, entusiasmo e dedicação. Você foi muito importante para a realização desse trabalho.

À Plataforma de Sequenciamento de Sanger e ao Instituto René Rachou/Fiocruz Minas pelo fornecimento da infraestrutura e suporte. Em especial à Renata que sempre me ajudou a solucionar os problemas com muita disposição.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia e a todos os professores do departamento que contribuíram para o meu desenvolvimento e formação.

Às pessoas residentes em áreas endêmicas para malária, por estarem dispostos a participar de estudos científicos e por confiarem no nosso trabalho.

Aos amigos da turma de mestrado em Parasitologia da UFMG (2021), Aline Marzano, Ana Carolina, Marcela, João Alexsander e Luiz Gustavo pela cumplicidade, carinho e amizade.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária, pelo apoio, amizade, companheirismo e pelos cafezinhos necessários para continuar o trabalho. Em especial à Madu, Samick, Sofia, Gabi Assis, Luiz, Maria Fernanda, Yanka, Carol, Karla, Geraldo.

Aos meus amigos da vida, por sempre acreditarem no meu potencial e tornarem a vida mais leve. À Júlia Quintaneiro por ser minha duplinha na faculdade e minha socia no Potencial Biótico, por me apoiar em todos os momentos, ser uma amiga

Agradecimentos

dedicada e me motivar a ser uma cientista e uma divulgadora científica melhor. Aos meus amigos Rafael Garofolo, Clara Carvalho, Marcela Cosendy, Ana Paula, Igor Santana, Maria Clara, Izabella Barbosa, Lucas, Jonathan e Tamiris Vanessa por estarem presentes nos momentos mais importantes.

Ao meu namorado Darcio, pelo companheirismo, amizade, carinho, amor, cumplicidade e por me apoiar em todos os momentos. Amo compartilhar a vida com você.

À minha família, pelo carinho, apoio e por serem um exemplo para mim, em especial à minha tia Tereza, Conceição, Viviane, Gislene, Lou e Cris. Aos meus pais e ao meu irmão por serem meu porto seguro em todos nos momentos.

RESUMO

A invasão dos eritrócitos pelos parasitos da malária garante o sucesso da infecção humana e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença clínica. No caso *Plasmodium vivax*, o processo de invasão do parasito nos reticulócitos é altamente dependente da interação entre a região II da proteína apical *Duffy binding protein* (DBPII) e seu receptor presente na superfície dos eritrócitos, o antígeno do grupo sanguíneo receptor *Duffy* para quimiocinas (DARC). No entanto, descobertas recentes de que o *P. vivax* pode invadir eritrócitos DARC-negativos por meio de uma rota alternativa, ainda desconhecida, reforçam a hipótese de que o mecanismo de invasão deste parasito é muito mais complexo do que se pensava inicialmente. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo estudar a diversidade genética de uma proteína recentemente descrita do *P. vivax*, denominada *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2), que possui todas as características principais das proteínas de ligação a eritrócitos, como a DBPII, sugerindo um papel no processo de invasão dos eritrócitos. Mais especificamente, avaliou-se a diversidade genética do domínio *Duffy binding like* (DBL) (região II) de EBP2 na região Amazônica, onde *P. vivax* é o principal causador da malária. Para isso, amostras de DNA de 71 pacientes cuja infecção por *P. vivax* foram adquiridas em diferentes estados da Amazônia brasileira (Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Rondônia, Roraima e Pará) foram utilizadas para amplificar os genes *ebp2* por protocolos baseados em PCR (nucleotídeos 477-1455; aminoácidos 159-485). Para comparar o grau de variabilidade genética entre a região II de EBP2 e DBPII, parte das amostras (n = 43) também foi amplificada por PCR para o gene *dbpII* (1245 pb; nucleotídeos 504-1748; aminoácidos 168-582). Para ambos os genes, os produtos de amplificação foram purificados com a enzima ExoSAP-IT, conforme descrito pelo fabricante (Affymetrix® - Product Numbers 78200/01/02/05), e submetidos à reação de sequenciamento Sanger. As sequências foram alinhadas e comparadas com sequências de referência disponíveis no GenBank. Para avaliar a variabilidade genética global do gene *ebp2*, foram realizadas análises adicionais utilizando todas as sequências de *ebp2* disponíveis no GenBank, que incluíram sete países: Camboja, Madagascar, Mianmar, Papua-Nova Guiné, Coreia do Sul, Tailândia e Vietnã. Em conjunto, os resultados aqui apresentados permitiram demonstrar que (i) o gene *ebp2* foi detectado em todas as amostras brasileiras; esses resultados sugerem que a deleção do gene *ebp2*, descrita em alguns isolados de *P. vivax*, não parece ser comum no Brasil; (ii) nas amostras estudadas, o gene que codifica a DBPII demonstrou ser muito mais polimórfico quando comparado ao da EBP2. Especificamente, 19 SNPs e 18 haplótipos foram identificados para *dbpII* e apenas 9 SNPs e 12 haplótipos para *ebp2*. A diversidade de nucleotídeos (π) de *dbpII* foi muito maior ($\pi = 0,00698$) do que *ebp2* ($\pi = 0,00145$); (iii) o haplótipo de referência *ebp2* (Camboja, C127) foi predominante no Brasil e em todos os países estudados, o que confirma a baixa variabilidade genética da proteína. Em conclusão, este estudo pioneiro da variabilidade genética do gene *ebp2* fornece evidências de que a região II da EBP2 é menos polimórfica que a DBPII, incluindo diferentes áreas de transmissão da Amazonia brasileira. Os resultados aqui apresentados são relevantes, pois sugerem que as vacinas baseadas em PvEBP2 podem considerar estratégias de poucos haplótipos para ter como alvo as principais populações de *P. vivax* que circulam pelo mundo.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium vivax*, proteínas de ligação ao eritrócito, variabilidade genética, candidatos vacinais, proteína de ligação ao eritrócito 2.

ABSTRACT

The invasion of erythrocytes by malaria parasites guarantees the success of human infection and, consequently, the development of clinical disease. In the case of *P. vivax*, the process of invasion of the parasite into reticulocytes is highly dependent on the interaction between region II of the apical protein Duffy binding protein (DBP_{II}) and its receptor present on the surface of erythrocytes, the blood group antigen Duffy receptor for chemokines (DARC). However, recent findings that *P. vivax* can invade DARC-negative erythrocytes through an alternative pathway, and still unknown, reinforce the hypothesis that the invasion mechanism of this parasite is much more complex than initially thought. In this context, the present study aimed to gain insight on the natural genetic diversity of a recently described *P. vivax* protein, named erythrocyte binding protein 2 (EBP2), which harbor all the key features of erythrocytes binding proteins such as DBP_{II}, suggesting a role into RBC invasion process. More specifically, we evaluated the genetic diversity of the Duffy binding like (DBL) domain (region II) of PvEBP2 in the Amazon Basin, where *P. vivax* is the predominant malaria parasite. For this, DNA samples from 71 patients whose *P. vivax* infection were acquired in different States of the Brazilian Amazon (Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Rondônia, Roraima and Pará) were used to amplify the *ebp2* genes by PCR-based protocols (nucleotides 477-1455; amino acids 159-485). To compare the degree of genetic variability between region II of EBP2 and DBP_{II}, part of samples (n = 43) was also PCR-amplified to the *dbpII* gene (1245bp; nucleotides 504-1748; amino acids 168-582). For both genes, the amplification products were purified with the ExoSAP-IT enzyme as described by the manufacturer (Affymetrix® - Product Numbers 78200/01/02/05) and subjected to the Sanger sequencing reaction. Sequences were aligned and compared with reference sequences available in GenBank. To identify the worldwide genetic variability of *ebp2* gene, additional analyzes were conducted using all *ebp2* sequences available in GenBank from eight countries: Cambodia, Madagascar, Myanmar, Papua New Guinea, South Korea, Thailand, and Vietnam. Taken together, our results demonstrated that (i) *ebp2* gene was detected in all Brazilian samples; these results suggest that the *ebp2* gene deletion described in some *P. vivax* isolates does not appear to be common in Brazil; (ii) in the studied samples, the gene that encodes DBP_{II} demonstrated to be much more polymorphic when compared to that of PvEBP2. Specifically, 19 SNPs and 18 haplotypes were identified for *dbpII* and only 9 SNPs and 12 haplotypes for *ebp2*. The nucleotide diversity (π) of *dbpII* was much higher ($\pi = 0.00698$) than *ebp2* ($\pi = 0.00145$); (iii) of interest, the reference *ebp2* haplotype (Cambodia, C127) was the predominant haplotype in Brazil and in all countries studied, which confirms the low genetic variability of the protein. In conclusion, this pioneering study of the genetic variability of the *ebp2* gene provides evidence that region II of EBP2 is less polymorphic that of DBP_{II} in different transmission settings of the Brazilian Amazon region. The results suggest that PvEBP2-based vaccines should consider few haplotypes strategies to target the main *P. vivax* parasite populations circulating around the world.

Keywords: malaria, *Plasmodium vivax*, erythrocyte binding proteins, genetic variability, vaccine candidates, erythrocyte binding protein 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência global de malária no ano de 2020.	21
Figura 2. Mapa de risco de transmissão da malária no Brasil por município em 2020.	23
Figura 3. Número de casos de malária notificados por espécie de plasmódio na região amazônica entre 1959 e 2020.	24
Figura 4. Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Plasmodium vivax</i> no hospedeiro vertebrado (humano) e no invertebrado (mosquito do gênero <i>Anopheles</i>).	28
Figura 5. Representação esquemática de estruturas e organelas do merozoíto de <i>Plasmodium</i>	29
Figura 6. Modelo esquemático representando as etapas envolvidas na invasão do eritrócito por merozoítos do <i>Plasmodium</i>	30
Figura 7. Representação esquemática da interação entre a <i>Duffy binding protein</i> (DBP) de <i>Plasmodium vivax</i> e o receptor <i>Duffy</i> para quimiocinas (DARC) nos reticulócitos.	32
Figura 8. Representação esquemática dos domínios estruturais da proteína <i>Duffy Binding Protein</i> (DBP) de <i>Plasmodium vivax</i>	33
Figura 9. Representação esquemática comparando os domínios estruturais da proteína <i>Duffy Binding Protein</i> (DBP) e da proteína <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP2) de <i>Plasmodium vivax</i>	35
Figura 10. Árvore filogenética demonstrando a relação entre as sequências das proteínas de ligação aos eritrócitos (EBPs) de <i>P. vivax</i> , <i>P. cynomolgi</i> , <i>P. simiovale</i> e <i>P. knowlesi</i>	36
Figura 11. Desenho esquemático mostrando os principais antígenos candidatos às vacinas de estágio sanguíneo de <i>Plasmodium vivax</i>	39
Figura 12. Mapa do Brasil com os isolados de <i>Plasmodium vivax</i> sequenciados para a região II da <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP2).	44

Figura 13. Representação esquemática dos iniciadores desenhados para amplificação e sequenciamento do domínio DBL do gene que codifica a <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP2) de <i>Plasmodium vivax</i>	48
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose do <i>ebp2</i> de <i>Plasmodium vivax</i>	57
Figura 15. Número de amostras amplificadas para a região II da <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP2) de <i>Plasmodium vivax</i>	58
Figura 16. Eletroferograma parcial da sequência de DNA da região II da <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP2) de <i>Plasmodium vivax</i>	59
Figura 17. Haplótipos representando a região II da EBP2 de <i>P. vivax</i> em 71 amostras da Amazônia brasileira.	60
Figura 18. Mapa mostrando a distribuição e frequência por região amazônica dos haplótipos EBP2 (região II).....	61
Figura 19. Descrição dos polimorfismos não-sinônimos (nsSNPs) para a região II da EBP2 de <i>P. vivax</i> e suas frequências em cada região da Amazônia brasileira.	62
Figura 20. Mapeamento das substituições de aminoácidos identificadas para a região II da <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP2) em amostras de <i>Plasmodium vivax</i> da Amazônia brasileira.	63
Figura 21. Amostras sequenciadas para a região II da <i>Duffy binding protein</i> (DBPII) e da <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP2) de <i>Plasmodium vivax</i> por estado da Amazônia Legal.....	64
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose ilustrando a banda de 990 pb correspondente ao gene <i>dbpII</i> de <i>Plasmodium vivax</i>	65
Figura 23. Haplótipos representando DBPII e região II de EBP2 de <i>P. vivax</i> da Amazônia brasileira.....	66
Figura 24. Descrição dos polimorfismos não-sinônimos (nsSNPs) para DBPII de <i>P. vivax</i> e suas frequências em cada região da Amazônia brasileira.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados na reação de PCR convencional para amplificação do domínio DBL do gene que codifica a <i>Duffy binding protein</i> (DBP _{II}) de <i>Plasmodium vivax</i>	46
Tabela 2. Ciclo no termociclador utilizado na reação de PCR convencional para amplificação do domínio DBL do gene que codifica a <i>Duffy binding protein</i> (DBP _{II}) de <i>Plasmodium vivax</i>	47
Tabela 3. Reagentes utilizados na reação de amplificação do domínio DBL do gene que codifica a <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP ₂) de <i>Plasmodium vivax</i>	49
Tabela 4. Ciclo no termociclador utilizado na reação de amplificação do domínio DBL do gene que codifica a <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP ₂) de <i>Plasmodium vivax</i>	50
Tabela 5. Pares de oligonucleotídeos iniciadores senso (Forward) e anti-senso (Reverse) desenhados para amplificação e sequenciamento do domínio DBL do gene que codifica a <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP ₂) de <i>Plasmodium vivax</i>	51
Tabela 6. Diversidade genética da região II dos genes que codificam as proteínas DBP _{II} e EBP ₂ de <i>Plasmodium vivax</i> em amostras de regiões endêmicas para malária no Brasil.....	68
Tabela 7. Estimativas de diversidade genética para o domínio DBL da <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP ₂) de <i>Plasmodium vivax</i> em isolados de áreas endêmicas de malária.	73
Tabela 8. Índices de neutralidade para o gene que codifica a região II da <i>Erythrocyte binding protein 2</i> (EBP ₂) de <i>Plasmodium vivax</i> amostrados em diferentes países endêmicos para malária.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácido

AMA-1 – Antígeno 1 de membrana apical (*Apical membrane antigen 1*)

CD71/TfR1 – Proteína receptora de transferrina 1 (*Transferrin receptor protein 1*) que se liga a PvRBP-2b (Proteína 2b de *P. vivax* de ligação aos reticulócitos)

CD98 – Glicoproteína composta por SLC3A2 e SLC7A5 que se liga a PvRBP-2a (Proteína 2a de *P. vivax* de ligação aos reticulócitos)

DARC – Antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (*Duffy antigen/receptor for chemokines*)

DBL – Domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*Duffy binding like domain*)

DBL-EBPs – Família de proteínas que se ligam aos eritrócitos e apresentam um domínio de ligação semelhante ao que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*Duffy binding like domain-Erythrocyte binding protein*)

dbp – Gene que codifica a proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC

DBP – Proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*Duffy binding protein*)

DBP-DARC – Ligação entre a proteína DBP (proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC) e o Antígeno DARC (antígeno Duffy/receptor para quimiocinas)

DBPII – Domínio de ligação (região II) da proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*Duffy binding protein II*)

dbpII – Gene que codifica o domínio de ligação (região II) da proteína que se liga ao antígeno Duffy/DARC

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EBA-140 (BAEBL) – Antígeno de 140 kDa que se liga a eritrócito (140 kDa *erythrocyte binding antigen*)

EBA-175 – Antígeno de 175 kDa que se liga a eritrócito (175 kDa *erythrocyte binding antigen*)

EBL – Super família de proteínas de ligação aos eritrócitos (*erythrocyte binding ligand*)

EBP2 – Proteína que se liga ao eritrócito 2 (*Erythrocyte binding protein 2*)

ebp2 – Gene que codifica a proteína que se liga ao eritrócito 2 (*Erythrocyte binding protein 2*)

Lista de abreviaturas

- EBPs** – Proteínas que se ligam ao eritrócito (*Erythrocyte binding protein*)
- ECD** – Domínio amino-terminal extracelular (*Extracellular amino-terminal domain*)
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- FST** – Índice de diversidade genética
- GPI** – Glicosilfosfatidilinositol
- H** – Número de haplótipos
- Hd** – Diversidade haplotípica
- IgG1** – Imunoglobulina G subclasse 1
- IgG3** – Imunoglobulina G subclasse 3
- IPA** – Incidência parasitária anual
- kb** – Kilobase
- kDa** – Kilodalton
- mL** – Mililitro
- MSP-1** – Proteína 1 de superfície do merozoíto (*Merozoite surface protein 1*)
- MSP-2** – Proteína 2 de superfície do merozoíto (*Merozoite surface protein 2*)
- MSPs** – Proteínas de superfície do merozoíto (*Merozoite Surface Protein*)
- NCBI** – Centro Nacional de informações sobre biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*)
- Nested PCR** – Reação em cadeia da polimerase aninhada
- ng** – Nanograma
- nsSNP** – substituições não-sinônimas (*Non-synonymous single nucleotide polymorphisms*)
- OMS** – **Organização** Mundial de Saúde
- pb** – par de bases
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- PEP** – potencial efeito protetor
- PkDBP** – Proteína de parasito símio da malária *P. knowlesi* que se liga ao antígeno Duffy/DARC
- PNCM** – Programa Nacional de Controle da Malária
- PNH** – primatas não humanos
- PvCSP** – Proteína circumsporozoíto de *P. vivax* (*P. vivax circumsporozoite protein*)

PvDBP – Proteína de *P. vivax* que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*P. vivax Duffy binding protein*)

PvDBPII – Domínio de ligação (região II) da proteína de *P. vivax* que se liga ao antígeno Duffy/DARC (*P. vivax Duffy binding protein II*)

PvEBP2 – Proteína de *P. vivax* que se liga ao eritrócito 2 (*Erythrocyte binding protein 2*)

PvRBP – Proteína de ligação do *P. vivax* a reticulócitos (*P. vivax Reticulocyte Binding Protein*)

PvRBP-2a – Proteína 2a de *P. vivax* que se liga a reticulócito (*P. vivax Reticulocyte binding protein 2a*)

PvRBP-2b – Proteína 2b de *P. vivax* que se liga a reticulócito (*P. vivax Reticulocyte binding protein 2b*)

Pvs25 – Proteína de superfície de oocineto de *P. vivax* (*P. vivax Ookinete Surface Protein*)

RBC – Célula sanguínea vermelha (*Red blood cell*)

RBL – Super família de proteínas de ligação aos reticulócitos (*Reticulocyte binding-like*)

RBP2a-CD98 – Ligação entre a proteína 2a de *P. vivax* de ligação aos reticulócitos (PvRBP-2a) e a glicoproteína composta por SLC3A2 e SLC7A5 (CD98)

RBP2b-TfR1 – Ligação entre a proteína 2b de *P. vivax* de ligação aos reticulócitos (PvRBP-2b) e a proteína receptora de transferrina 1 (TfR1)

RON2 – proteína de pescoço das rôprias 2 (*Rhoptry Neck Protein 2*)

RPM – Rotação por minuto

S – Sítios segregantes

SD – Desvios padrão

Semi-Nested PCR - Reação em cadeia da polimerase semi-aninhada

SNP(s) – Polimorfismo(s) de base única (*Single nucleotide polymorphism*)

sSNP – substituição era sinônima (*synonymous single nucleotide polymorphisms*)

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

μL – Microlitro

μM – Micrómetro

π – Diversidade nucleotídica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Epidemiologia da malária humana no Brasil.....	22
1.2 Ciclo biológico e particularidades de <i>Plasmodium vivax</i>	24
1.2.1 Invasão de reticulócitos por <i>Plasmodium vivax</i>	28
1.3 Vacinas contra os estágios sanguíneos de <i>Plasmodium vivax</i>	38
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Declaração de Ética	43
4.2 População de Estudo	43
4.3 Extração de DNA genômico.....	44
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	45
4.4.1 Amplificação da DBPII de <i>Plasmodium vivax</i>	45
4.4.2 Amplificação da EBP2 de <i>Plasmodium vivax</i>	47
4.5 Purificação e Sequenciamento de Sanger	52
4.6 Análise de dados.....	53
4.6.1 Análise dos Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).....	53
4.6.2 Diversidade Genética e testes de neutralidade.....	53
4.6.3 Modelagem Molecular.....	54
4.6.4 Análises das sequências de EBP2 disponíveis na literatura.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1 Comparação entre as técnicas de amplificação para EBP2.....	56

5.2 Variabilidade genética da EBP2 em parasitos circulantes em áreas endêmicas para malária no Brasil	58
5.2.1 Diversidade genética da região II da EBP2.....	58
5.2.2 Mapeamento de SNPs na estrutura da EBP2.....	62
5.3 Comparação entre a variabilidade genética da EBP2 e DBPII em parasitos circulantes em áreas endêmicas brasileiras	64
5.4 Variabilidade genética global da EBP2	68
5.4.1 Diversidade Genotípica e haplotípica da região II da EBP2.....	68
5.4.2 Diferenciação genética da EBP2 entre as diferentes regiões geográficas	74
5.4.3 Testes de neutralidade.....	75
6. DISCUSSÃO	76
6.1 Prevalência da EBP2 em parasitos circulantes em áreas endêmicas brasileiras	76
6.2 Comparação entre a variabilidade genética da DBPII e EP2 (região II).....	77
6.3 Variabilidade genética global da EBP2 (região II).....	80
7. CONCLUSÃO	84
8. REFERÊNCIAS.....	85
9. ANEXO I.....	108

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecto-parasitária de grande relevância para a saúde pública global devido a sua elevada morbidade e letalidade, particularmente, atingindo populações em situações de vulnerabilidade da África, sudeste asiático e América Latina (WHO, 2022). Ela é causada por protozoários do filo Apicomplexa, Família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Possuem como vetores insetos fêmeas infectadas da ordem Diptera, família Culicidae e gênero *Anopheles* (Sinka et al., 2012).

Quatro espécies de plasmódios estão mais frequentemente associadas a infecção humana - *Plasmodium falciparum* (Welch, 1898), *Plasmodium vivax* (Grassi & Felitti, 1889), *Plasmodium ovale* spp. (Stephens, 1922), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881). *Plasmodium falciparum* é o mais virulento, responsável pelo maior número de óbitos - principalmente crianças abaixo de 5 anos - e o mais prevalente no continente africano (Artavanis-Tsakonas et al., 2003; Haldar et al., 2007; Miller et al., 2013; Moxon et al., 2020). Por outro lado, *P. vivax* tem maior distribuição mundial e está frequentemente associado a uma malária não complicada com níveis variáveis de morbidade (Adams & Mueller, 2017; WHO, 2022). Apesar disto, o impacto econômico e a gravidade da malária causada por essa espécie foram subestimados por muito tempo. Nos últimos anos, diferentes estudos têm confirmado quadros de malária complicada por *P. vivax*, incluindo anemia grave, síndrome do desconforto respiratório agudo, coma e morte (Genton et al., 2008; Tjitra et al., 2008; Costa et al., 2012; Castro-Gomes et al., 2014). Também foram identificadas biomassas deste parasito em nichos hematopoiéticos localizados, principalmente, na medula e no baço, locais ricos em reticulócitos jovens (Barber et al., 2015; Obaldia et al., 2018; Kho et al., 2021). Estes nichos têm sido frequentemente associados aos casos mais graves de malária (revisto por Silva-Filho et al., 2020). Além disso, certas particularidades biológicas de *P. vivax* contribuem para o difícil controle dessa espécie, incluindo: i) formas latentes no fígado (hipnozoítos), responsáveis pelas recaídas frequentes da doença (Coatney, 1976; Krotoski, 1989); ii) formação precoce de gametócitos, favorecendo a infecção dos vetores (McKenzie et al., 2002; Collins et al., 2004; Ferreira e Castro, 2016); iii) invasão apenas de reticulócitos, que estão presentes na

circulação em baixa percentagens, resultando em parasitemias subpatentes não detectadas pelo diagnóstico de rotina (Kitchen, 1938; Moreno-Pérez et al., 2013; Zimmerman et al., 2013) e iv) resistência emergente a medicamentos antimaláricos (Ferreira; Castro, 2016).

P. ovale spp. e *P. malariae* são pouco conhecidos, uma vez que os estudos disponíveis sobre essas espécies são mais escassos em comparação com *P. vivax* e *P. falciparum*. *P. ovale* spp possui duas subespécies (*P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri*) (Sutherland et al., 2010) e está distribuído principalmente na África Ocidental e em alguns países do Sudeste Asiático (Coatney et al. 2003; Mueller, Zimmerman e Reeder, 2007). Apesar das infecções por *P. ovale* spp. estarem geralmente associadas a baixa morbidade e mortalidade, complicações graves, como síndrome do desconforto respiratório agudo, insuficiência renal, e morte já foram relatadas (Hwang et al., 2014; Lau et al., 2013). Além disso, assim como *P. vivax*, *P. ovale* spp estabelece formas latentes (hipnozoítos) no fígado, podendo desencadear um novo quadro de malária clínica (White, 2011).

P. malariae apresenta semelhanças morfológicas, genéticas e imunológicas, com o *P. brasilianum* (Gonder & Von Berenberg-Glosser, 1908; Fandeur et al., 2000; Volney et al., 2002; Tanomsing et al., 2007; Lalremruata et al., 2015), sendo considerados como variantes da mesma espécie (revisto por Hans-Peter, Campino e Sutherland, 2022). Essa espécie possui uma ampla distribuição, sendo relatada na África subsaariana, sudeste asiático e América (Collins e Jeffery, 2007). A malária clínica causada por *P. malariae* tem sido relatado como não grave, complicada ou com risco de vida, embora a literatura contenha relatos de mortalidade devido à anemia grave em crianças com infecções crônicas (Langford et al., 2015). Além disso, *P. malariae/P. brasilianum* apresenta um caráter de transmissão zoonótico, uma vez que esta última espécie é considerada um parasito primariamente de primatas não humanos (PNH) (Coatney et al., 2003; Lalremruata et al., 2015). Mais recentemente, também foram descritas transmissões zoonóticas de *P. knowlesi* (Sinton & Mulligan, 1932) e *P. simium* (Da Fonseca, 1951), no sudeste asiático e na mata atlântica brasileira, respectivamente (Cox-Singh & Singh, 2008; White et al., 2008; Cox-Singh, 2012; Brasil et al., 2017). O contexto da transmissão zoonótica da malária trouxe um

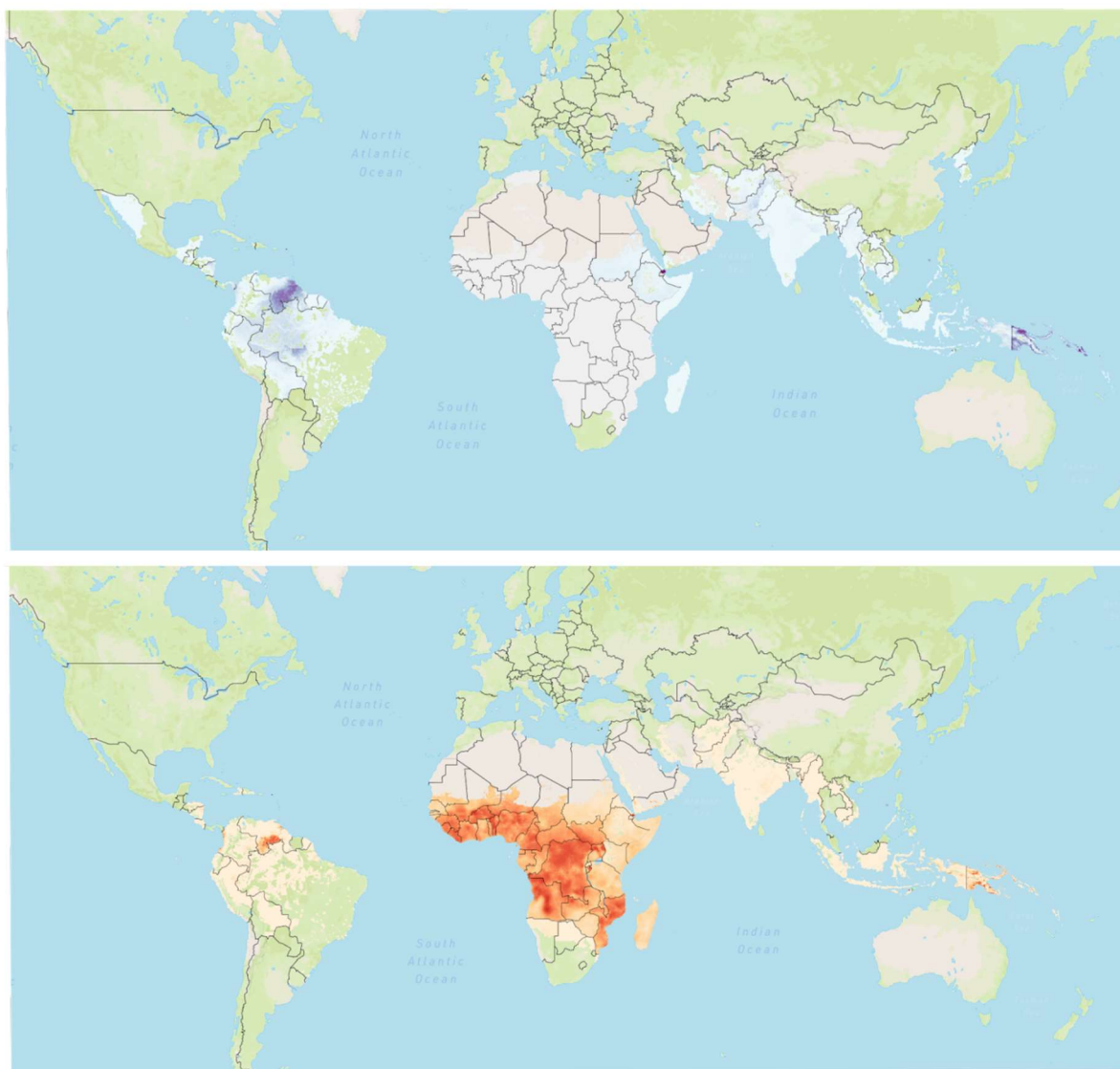
novo desafio para o contexto da eliminação desta doença. Necessitando mais estudos para uma melhor compreensão da biologia desses parasitos provenientes de primatas não humanos.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que no ano de 2021 foram registrados 247 milhões de casos de malária e 619.000 óbitos em 84 países endêmicos, incluindo o território da Guiana Francesa (Figura 1) (WHO, 2022). A ocorrência da malária está associada principalmente aos países subdesenvolvidos, que apresentam temperatura elevada, alta umidade e uma precipitação adequada para o desenvolvimento dos vetores (Greenwood et al., 2008; WHO, 2022). De fato, essas condições ambientais, associadas com o baixo desenvolvimento econômico, a instabilidade social e a falta de recursos para o diagnóstico rápido e o tratamento adequado, favorecem o aumento do número de casos da doença (Phillips et al., 2017; Ashley et al., 2018).

Na América Latina, Venezuela, Brasil e Colômbia são os países de maior importância epidemiológica para malária e, juntos, representam mais de 79% de todos os casos nesta região (WHO, 2022). É importante ressaltar que o aumento no número de casos de malária na Venezuela tem sido decorrente de uma crise socioeconômica e humanitária que tem ocorrido no país nos últimos anos (Grillete et al., 2019). Embora a Venezuela tenha sido o primeiro país a receber o certificado pela OMS a erradicar a malária em suas áreas mais populosas em 1961, o país foi considerado o mais afetado da América Latina em 2018 (WHO, 2019). A Venezuela registrou um aumento de 209% no número de casos em 2018 em comparação com 2015 (WHO, 2019). Essa situação afeta os países vizinhos e estima-se que cerca de 78% e 81% dos casos importados de malária no Brasil e na Colômbia, respectivamente, venham da Venezuela. A situação desse país ressalta a necessidade de esforços conjuntos de controle da malária por parte dos países amazônicos da região (Recht et al., 2017).

Figura 1. Incidência global de malária no ano de 2020.

Em roxo está representado a incidência global de *Plasmodium vivax* e em vermelho está indicado a incidência global de *P. falciparum* no ano de 2020.



Fonte: mapa construído em malariaatlas.org.

A pandemia de COVID-19, causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), trouxe um cenário desafiador para o controle da malária. Entre 2019 e 2020, houve cerca de 13,4 milhões de casos de malária, sendo associados às interrupções dos serviços locais de controle decorrentes da pandemia (WHO, 2022). Nesse contexto, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu diretrizes para auxiliar os países a identificarem os serviços essenciais a serem priorizados, como a distribuição de medicamentos e serviços médicos de urgências e emergência (WHO, 2020).

Em 2015, a Organização Mundial de Saúde (OMS) implementou um plano global, chamado “Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030” (*Global technical strategy for malaria 2016-2030*, GTS), visando reduzir a incidência e a mortalidade da malária em pelo menos 90% até 2030, (atualizado por WHO, 2021). As ações de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento específico foram de extrema importância para a significativa redução do número de casos e óbitos por malária nos últimos anos. No entanto, como a doença ainda afeta milhões de pessoas no mundo e a atuação dos serviços de controle foi prejudicada devido à pandemia de COVID-19, estima-se que as metas estabelecidas pela GTS (2016-2030) podem estar longe de serem atingidas (GTS/WHO, 2021).

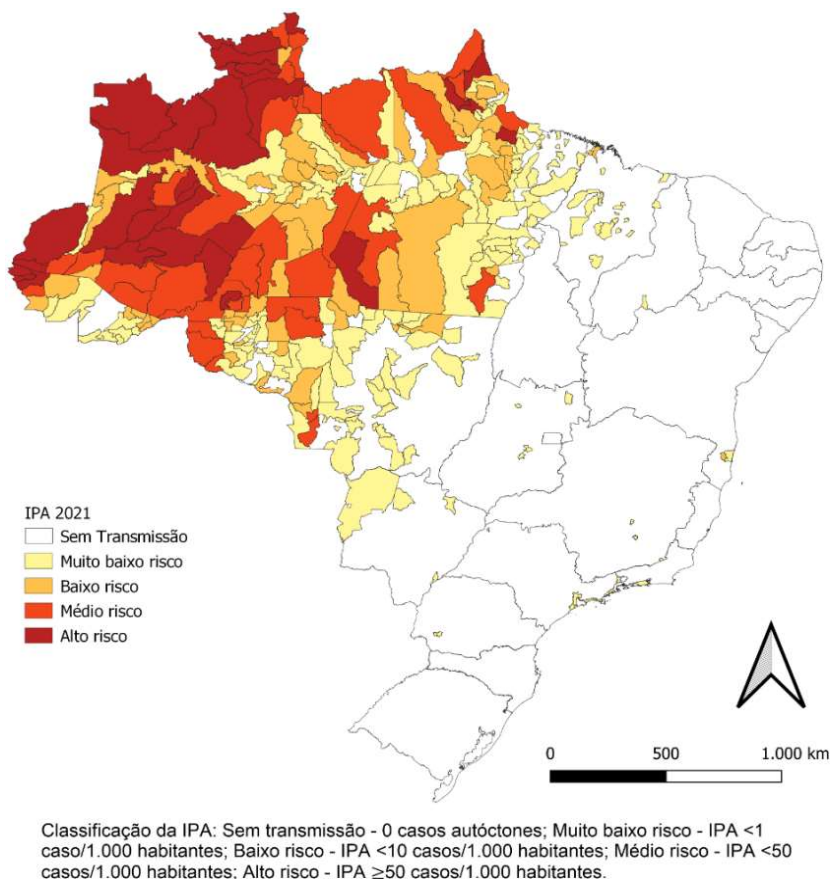
1.1 Epidemiologia da malária humana no Brasil

No Brasil, as principais espécies causadoras de malária são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2021 foram registrados 139.211 casos e 49 óbitos por malária no país, representando um aumento de 11,4% em comparação a 2020. Do total de casos autóctones, cerca de 17% (23.408) foram por *P. falciparum* e 83% (114.449) por *P. vivax* e malária não-falciparum (SVS/MS, 2022).

A região da Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (SVS/MS, 2015) é considerada área endêmica para malária no país, registrando cerca de 99,9% dos casos autóctones com uma distribuição heterogênea (SVS/MS, 2022) (Figura 2). Essa situação é decorrente das particularidades sociodemográficas, políticas e ambientais da região amazônica. Além disso, é importante ressaltar que a transmissão zoonótica em áreas de Mata Atlântica tem ganhado relevância nos últimos anos (Brasil, 2017). Alguns trabalhos já demonstraram que os primatas neotropicais podem ser fontes de infecção para os casos humanos, particularmente envolvendo *P. simium* (Costa et al., 2014; De Alvarenga et al., 2015).

Figura 2. Mapa de risco de transmissão da malária no Brasil por município em 2020.

O risco é estimado a partir da Incidência Parasitária Anual (IPA), número de diagnósticos positivos para malária por 1000 habitantes, em uma determinada área, no período de um ano. Baseado no IPA, o risco é dividido entre baixo (IPA < 10 casos/mil habitantes), médio (IPA entre 10 e 49 casos/mil habitantes) e alto (IPA ≥ 50 casos/mil habitantes).



Fonte: SVS/MS, 2021.

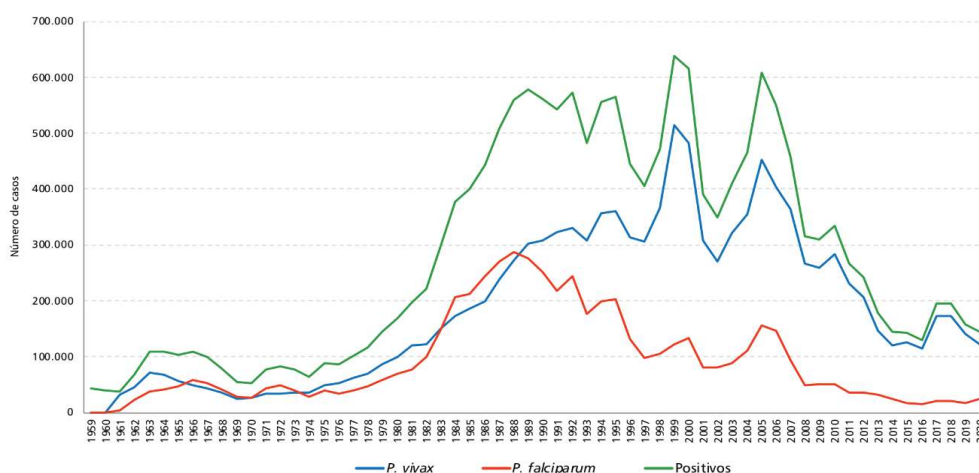
Historicamente, no período de 1965 até 1988, *P. vivax* e *P. falciparum* mantinham proporções muito próximas. A partir daquele ano, ocorreu uma redução drástica na proporção de *P. falciparum*, enquanto aqueles atribuídos ao *P. vivax* aumentaram significativamente (Oliveira-Ferreira et al., 2010; Siqueira et al., 2016). A redução de malária causada pelo *P. falciparum*, se deu principalmente pela ampliação da rede de diagnóstico e tratamento precoce, reduzindo as fontes de infecção para o mosquito vetor. No entanto, tendo em vista que as medidas de controle para essas duas espécies são diferentes, os casos de *P. vivax* continuaram aumentando ao longo dos anos e essa se tornou a espécie mais prevalente no Brasil. Embora os programas de controle de malária reduziram drasticamente a incidência da doença em todo o

mundo (WHO, 2016) -- incluindo no Brasil (SVS/MS, 2022) -- a transmissão por *P. vivax* ainda representa um enorme desafio (Figura 3).

O “Plano Nacional de Eliminação de Malária” (SVS/MS, 2022) visa mitigar o impacto da malária na saúde e subsistência das pessoas. Dentre os objetivos do plano, estão reduzir a quantidade de casos para menos de 14 mil e de óbitos para zero até 2030 e eliminar a doença no território brasileiro até 2035. Para isso, é necessária uma melhor compreensão da biologia de *P. vivax* e o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas, incluindo uma vacina. Nesse sentido, pesquisas que possam auxiliar na identificação e caracterização de antígenos candidatos à vacina se fazem necessários para o sucesso do plano de controle e eliminação da malária.

Figura 3. Número de casos de malária notificados por espécie de plasmódio na região amazônica entre 1959 e 2020.

No gráfico, os casos de malária denominados como por *P. vivax* inclui ainda um pequeno número de casos de malária não falciparum (casos autóctones de *P. malariae* e importados de *P. ovale*). Casos de malária falciparum incluem casos de malária por *P. falciparum* ou as infecções mistas desta espécie com outros plasmódios.



Fonte: SVS/MS, 2021). Dados do Sivep-Malária atualizados em: 17/8/2021. Dados do Sinan atualizados em: 26/7/2021.

1.2 Ciclo biológico e particularidades de *Plasmodium vivax*

Parasitas do gênero *Plasmodium* spp. possuem um complexo ciclo heteroxeno, com a participação obrigatória de dois hospedeiros, podendo ser dividido em duas fases: (1) fase assexuada ou esquizogônica no hospedeiro vertebrado; (2)

fase sexuada ou esporogônica no hospedeiro invertebrado, fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles* (Figura 4) (Crompton et al., 2014; Mueller et al., 2009).

Os esporozoítos, formas infectantes para o homem, são inoculados na derme através da picada de insetos fêmeas do gênero *Anopheles* infectadas durante o repasto sanguíneo (Amino et al., 2006; Gueirard et al., 2010; Sinka et al., 2012). Essas formas do parasito possuem uma locomoção clássica do filo Apicomplexa, chamada gliding ou deslizamento, que permite movimentos com alta velocidade, além de auxiliar a maquinaria de invasão na célula hospedeira (Cowman et al., 2016; Ménard et al., 2013).

Com essa motilidade deslizante, uma parte dos parasitos alcança e penetra um vaso sanguíneo, enquanto os que permanecem na pele são eliminados pela resposta imune desencadeada, e drenados pelos vasos linfáticos (Amino et al., 2006; Cowman et al., 2016; Ménard et al., 2013). Os esporozoítos que escapam dessa resposta imune inicial, se deslocam pela circulação sanguínea e atravessam os sinusóides hepáticos, chamados de barreira sinusoidal, por meio das células de Kupffer (Pradel e Frevert, 2001) e das células endoteliais (Tavares et al., 2013).

No fígado, o parasito migra pelos hepatócitos até finalmente invadir um deles e formar um vacúolo parasitóforo, dando início ao ciclo hepático assintomático para o homem (Mota et al., 2001). Nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam e se multiplicam assexuadamente, em um processo de esquizogonia tecidual, onde os esporozoítos se desenvolvem em esquizontes. Esses esquizontes formam milhares de merozoítos (Holz et al., 2016; Sturm et al., 2006). Nessa etapa, *P. vivax* e *P. ovale* conseguem estabelecer formas latentes (hipnozoítos) que permanecem dormentes por períodos variados e causar as recaídas na doença, desencadeando um novo quadro de malária clínica (Coatney, 1976; Krotoski, 1985, 1989; White, 2011).

As recaídas favorecem a infecção de novos mosquitos e, conseqüentemente, de outros hospedeiros vertebrados. Até o momento, os mecanismos envolvidos nessa reativação são pouco compreendidos. Alguns gatilhos que ativam os hipnozoítos e leva a recaídas em intervalos regulares pode ser a própria doença febril sistêmica (White, 2011) ou os parasitos são ativados de forma coordenada de acordo com um relógio biológico predeterminado geneticamente (Chen et al., 2007; de Araujo et al., 2012). A frequência das recaídas pode variar dependendo de vários fatores, incluindo

a região geográfica onde a infecção é adquirida, a idade e a imunidade do hospedeiro, a carga de esporozoítos no momento da infecção e a adesão ao tratamento (Commons et al., 2020; John et al., 2012; Pedro et al., 2012).

Após a multiplicação assexuada no fígado, os merozoítos são liberados dos hepatócitos por vesículas, chamadas merossomos, que iniciam o ciclo eritrocítico (Holz et al., 2016; Sturm et al., 2006). Na corrente sanguínea, os merozoítos interagem com as células alvo (eritrócitos) por um complexo processo com reconhecimento, reorientação e invasão, envolvendo diversas interações entre proteínas do parasito e receptores eritrocíticos (Cowman et al., 2017).

Diferente de outras espécies, *P. vivax* invade eritrócitos jovens, os reticulócitos, que representam cerca de 1% a 2% do total de glóbulos vermelhos circulantes, o que pode explicar a baixa parasitemia predominante dessa espécie e a alta frequência de infecções assintomáticas e submicroscópicas, que dificultam a detecção pelos métodos de diagnóstico convencional (Kitchen, 1938; Moreno-Pérez et al., 2013; Zimmerman et al., 2013). Dentro dos eritrócitos, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens, maduros e depois esquizontes (Mota et al., 2001). Esses esquizontes dão origem a merozoítos, rompem a hemácia, ficam livres na corrente sanguínea e estão aptos a invadir novas células, reiniciando o ciclo de invasão, que ocorre a cada 48 horas para *P. vivax* e *P. falciparum* (Cowman et al., 2016; White et al., 2014).

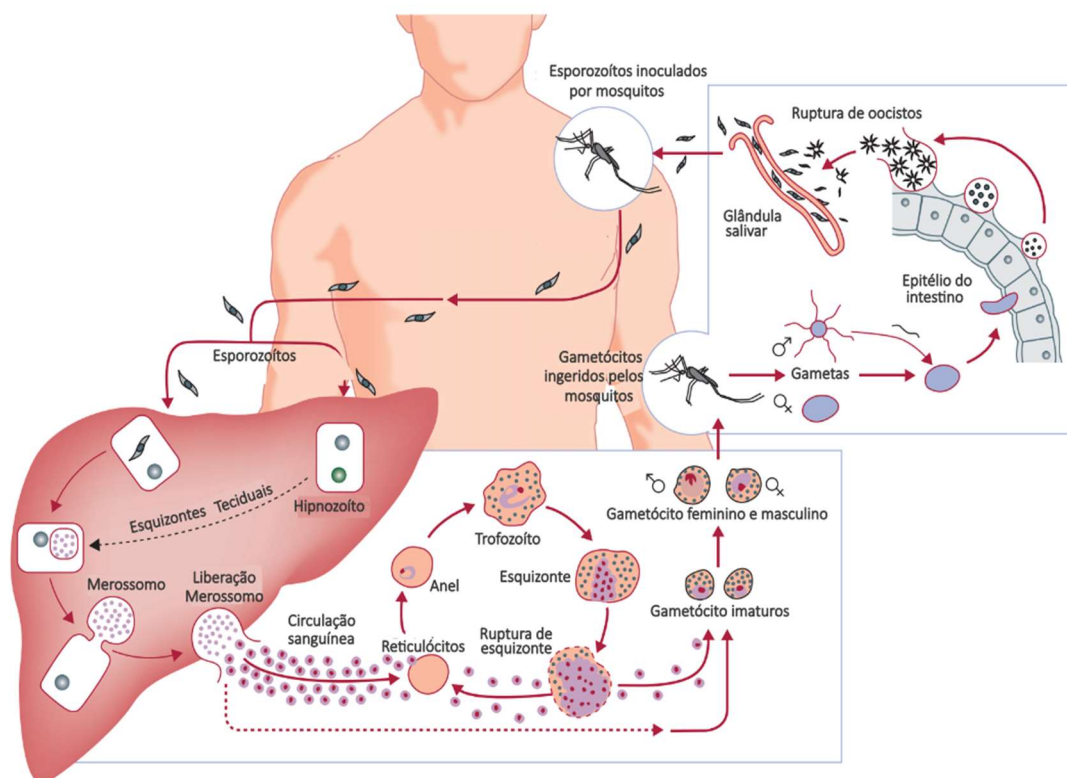
O ciclo eritrocítico é responsável pela manifestação clínica da malária, como febre, dor de cabeça, calafrios, náusea e fraqueza. Enquanto nas infecções por *P. vivax* são encontradas todas essas formas de desenvolvimento do estágio sanguíneo na circulação periférica, em *P. falciparum* não encontramos as formas assexuadas maduras em circulação (Mueller et al., 2009). Após sucessivas gerações de merozoítos sanguíneos, alguns deles se diferenciam em formas sexuais do parasito, os gametócitos femininos (macrogametócitos) e os gametócitos masculinos (microgametócitos), formas infectantes para o mosquito vetor (Barillas-Mury e Kumar, 2005; Sinden, 1983). Para *P. vivax*, é possível observar gametócitos na circulação periférica em uma semana após a inoculação do mosquito, antes do aparecimento dos sintomas, enquanto *P. falciparum* ocorre concomitante com o aparecimento dos sintomas (Bousema e Drakeley, 2011; Cowman et al., 2016; Meibalan e Marti, 2017).

Essa gametocitogênese precoce de *P. vivax*, contribui para um elevado potencial para transmissão, pois um indivíduo infectado, mas assintomático e, portanto, ainda não tratado, pode servir como um reservatório para a infecção dos vetores (Ferreira e Castro, 2016; McKenzie et al., 2002). Essas formas sexuais são ingeridas pela fêmea do mosquito anofelino durante o repasto sanguíneo e dão início a fase sexuada de ciclo, que ocorre no hospedeiro invertebrado (Crompton et al., 2014).

Na matriz peritrófica do vetor os gametócitos se diferenciam em gametas, ocorre a fertilização e é gerada uma forma diplóide chamada zigoto (Vlachou *et al.*, 2006). O zigoto amadurece, se torna móvel, passa a se chamar oocineto e invade a parede epitelial do intestino médio do mosquito. Ao chegar à lâmina basal do intestino médio, os oocinetos se diferenciam em oocistos, começam a se dividir continuamente por uma multiplicação assexuada e produzem milhares de esporozoítos (Baton e Ranford-Cartwright, 2004; Vlachou et al., 2004; Zieler e Dvorak, 2000). Os esporozoítos são liberados na hemolinfa do mosquito, alguns são eliminados pelo sistema de defesa do vetor, contudo uma parte considerável consegue invadir as glândulas salivares, podendo ser inoculados no hospedeiro vertebrado em um próximo repasto sanguíneo (Crompton et al., 2014; Meibalan e Marti, 2017).

Figura 4. Representação esquemática do ciclo biológico de *Plasmodium vivax* no hospedeiro vertebrado (humano) e no invertebrado (mosquito do gênero *Anopheles*).

Uma vez que os esporozoítos infecciosos são inoculados na pele pelos mosquitos anófeles fêmeas, eles atingem a corrente sanguínea e entram nos hepatócitos iniciando o estágio exoeritrocítico. Dentro do fígado, *P. vivax* pode: i) se diferenciar em esquizontes teciduais, que após milhares de replicações mitóticas em hepatócitos individuais liberam merozoítos na corrente sanguínea, ou ii) se diferenciar em um estágio dormente chamado hipnozoíto que, após ativação após meses ou anos, sofrem recaídas e iniciam o ciclo eritrocítico. Durante os estágios eritrocíticos, os merozoítos de *P. vivax* invadem os reticulócitos e o processo de desenvolvimento cíclico leva cerca de 48 h. Além disso, alguns parasitos de *P. vivax* podem se diferenciar em gametócitos maduros antes da doença clínica e se desenvolve, tendo assim a vantagem de transmissão contínua ao inseto vetor antes do aparecimento de sintomas clínicos e posterior tratamento. Os gametócitos circulantes ao serem absorvidos pela refeição sanguínea dos mosquitos anófeles, iniciam o ciclo sexual, que inclui a liberação dos gametas masculino e feminino, a fertilização e a formação de um oocineto móvel que atravessa o epitélio do intestino médio. A diferenciação em uma nova forma replicativa, conhecida como oocisto, liberação de esporozoítos, migração e invasão das glândulas salivares encerra o ciclo de vida no vetor. Os esporozoítos estão prontos para serem inoculados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do vetor e dar continuidade ao ciclo.



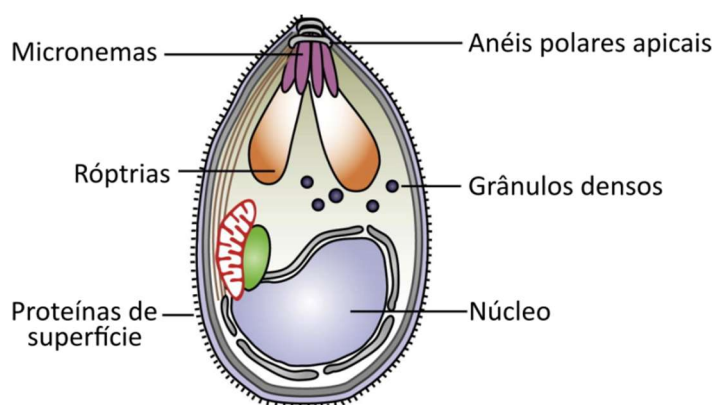
Fonte: Modificado de Mueller *et al.*, 2009.

1.2.1 Invasão de reticulócitos por *Plasmodium vivax*

A invasão dos reticulócitos pelo merozoíto de *P. vivax* garante a infecção humana e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença clínica. Para que *P. vivax* tenha sucesso nesse processo, é necessária a interação entre diferentes proteínas do parasito e receptores presentes na superfície dos reticulócitos. Os

merozoítos contêm todas as organelas necessárias para o reconhecimento e invasão dos eritrócitos, que inclui róptrias, grânulos densos e micronemas (De Niz et al., 2017) (Figura 5), que também estão presentes na porção apical de parasitos do filo Apicomplexa (Neves et al., 2022). O processo geral de invasão dos eritrócitos -- que envolve múltiplas proteínas do complexo apical e interações do tipo ligante-receptor -- é comum a diferentes espécies de plasmódios.

Figura 5. Representação esquemática de estruturas e organelas do merozoíto de *Plasmodium*.



Fonte: Ajustado de Tham, Beenson, Rayner (2017).

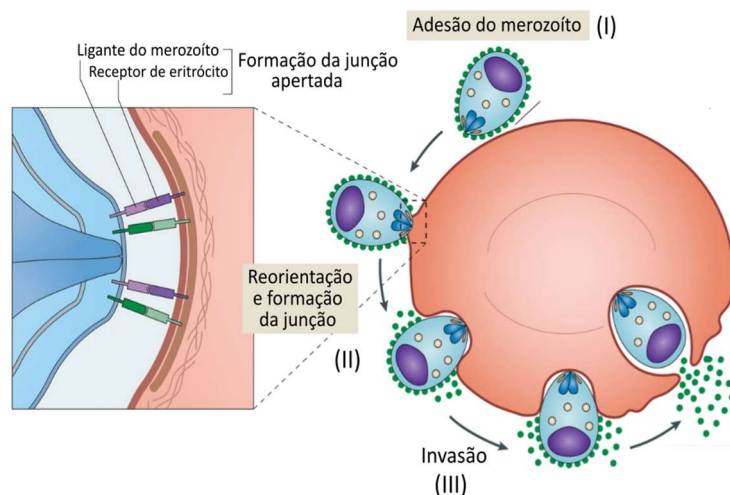
No caso dos plasmódios, incluindo *P. vivax* cujo tropismo é específico para os reticulócitos, o contato com a célula-alvo ativa eventos subsequentes que resultam na penetração do parasito e esse processo de invasão é complexo, rápido e envolve várias etapas: (I) adesão entre o merozoíto e o eritrócito; (II) seguido por uma reorientação do parasito, deixando as organelas do complexo apical em contato com a membrana da célula hospedeira e a formação de uma junção móvel que auxilia a entrada do parasito e (III) a invasão com formação de um vacúolo parasitóforo (Figura 6) (revisto por Cowman, 2017).

Inicialmente, os merozoítos de plasmódios podem se conectar a qualquer parte da sua superfície em uma célula sanguínea por meio de interações de baixa afinidade, mediadas por inúmeras proteínas de superfície do merozoíto (MSPs – *Merozoite Surface Protein*) (etapa I – Adesão, Figura 6) (Beeson et al., 2008). Após esse contato inicial, ocorre a reorientação da porção apical do parasito, onde as organelas secretórias estão localizadas. Nesse momento, proteínas de micronema

são expostas, como o antígeno de membrana apical - 1 (AMA1 – *Apical Membrane Antigen-1*) (etapa II - Reorientação, Figura 6) (Alaganan; Singh; Chitnis, 2017; Cowman et al., 2017). Em seguida, o merozoíto forma uma junção irreversível e de alta afinidade, formando um anel ao redor do parasito, que delimita o vacúolo parasitóforo da membrana da célula hospedeira. Essa junção é composta pela interação entre a proteína AMA1 e as proteínas de pescoço das róptrias - 2 (RON2 – *Rhoptry Neck Proteins*) (Srinivasan et al., 2011; Alexander et al., 2005; Riglar et al., 2011; Tonkin et al., 2011). A ligação entre o merozoíto e o eritrócito também é mediada por proteínas da família DBL/EBL (*Duffy binding-like* ou *Erythrocyte binding-like*) e RBL (*Reticulocyte binding-like*) (etapa II - Formação da Junção móvel, Figura 6) (Gilberger et al., 2003; Rayner et al., 2001; revisto por De Niz et al., 2017). A força motora de actina-miosina dos parasitos, fornece a motilidade e a força mecânica necessária para penetrar na célula hospedeira, pois atua empurrando o parasito para dentro, enquanto as interações ligante-receptor acontecem (Gilson; Crabb, 2009; Koch; Baum, 2016). Por fim, a invasão se completa quando o vacúolo parasitóforo se afasta da membrana em direção ao interior do eritrócito, com posterior fechamento da membrana da célula do hospedeiro (etapa III - Invasão, Figura 6). Essas etapas são comuns para outros plasmódios.

Figura 6. Modelo esquemático representando as etapas envolvidas na invasão do eritrócito por merozoítos do *Plasmodium*.

Na primeira etapa de invasão ocorre a adesão entre o parasito e a célula hospedeira, com uma posterior reorientação do merozoíto para colocar sua extremidade apical em contato com a membrana da hemácia (etapa I). Na segunda etapa, uma junção apertada é formada, mediada por receptores de eritrócitos e ligantes do parasito (etapa II). Na penetração do parasito ocorre a de um vacúolo parasitóforo (etapa III).



Fonte: ajustado de De Niz et al., 2017.

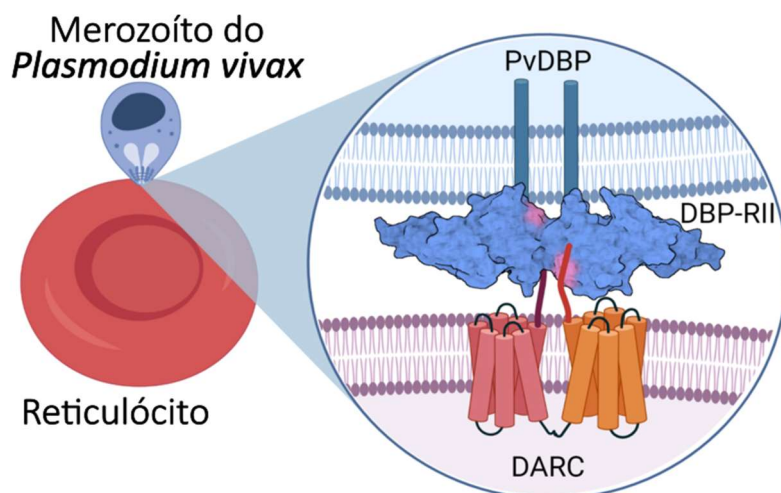
No caso de *P. vivax* as interações entre ligantes do parasito e receptores de reticulócitos ainda são pouco conhecidas. Atualmente, três interações do tipo ligante-receptor envolvidas na invasão dos reticulócitos por essa espécie têm sido mais bem caracterizadas (PvRBP2b-TfR1, PvRBP2a-CD98 e PvDBP-DARC) (Molina-Franky *et al.*, 2022). Entre estas, a mais bem estudada é a via de invasão mediada pela interação entre a *Duffy Binding Protein* (DBP), presente nas micronemas do parasito, e seu receptor nos eritrócitos, o antígeno de grupo sanguíneo *Duffy* receptor de quimiocinas (DARC) (Miller *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1992). Além da PvDBP, uma nova proteína capaz de se ligar a reticulócitos, a *Erythrocyte Binding Protein 2* (EBP2), também foi descrita (Hester *et al.*, 2013). Esta proteína compartilha características semelhantes às proteínas da família DBL/EBL, que estão envolvidas no processo de invasão dos merozoítos nos reticulócitos, sugerindo uma possível via alternativa de invasão por *P. vivax* (Hester *et al.*, 2013; Ntumgia *et al.*, 2016). Essas duas proteínas (DBP e EBP2) fazem parte do trabalho aqui apresentado e serão abordadas em mais detalhes no próximo tópico (itens 1.2.1 A e B).

Mais recentemente, a interação entre a proteína de ligação aos reticulócitos 2b (PvRBP2b), localizada nas micronemas, e a proteína do hospedeiro TfR1 (ou CD71), tem sido descrita como componente importante para a interação e/ou invasão dos reticulócitos por *P. vivax* (Gruszczyk *et al.*, 2018). A TfR1 é uma glicoproteína transmembranar expressa em grandes quantidades em hemácias imaturas (reticulócitos) e gradualmente perdida durante a maturação das hemácias, até estar completamente ausente dos normócitos (Pan *et al.*, 1985). Por último, em 2021, foi caracterizada a interação entre a proteína de ligação a reticulócitos 2a (PvRBP2a) com o receptor CD98, uma glicoproteína transmembrana que também diminui sua expressão durante a maturação das hemácias (Malleret *et al.*, 2021). Esses achados sugerem que o mecanismo pelo qual *P. vivax* atinge com precisão os reticulócitos é complexo e envolver vários receptores e ligantes. No entanto, entender se outros ligantes também participam desse processo requer mais estudos.

A. Duffy binding protein (DBP) de *Plasmodium vivax*

Para a maior parte das variantes de *P. vivax*, a invasão dos reticulócitos é altamente dependente da interação entre a proteína do parasito *Duffy binding protein* (DBP) e o receptor *Duffy* receptor para quimiocinas (DARC), presente nos eritrócitos (ADAMS *et al.*, 1990, 1992) (Figura 7). Nesse sentido, indivíduos que não expressam o receptor DARC na superfície de seus reticulócitos, chamados DARC negativos, são altamente resistentes à infecção por *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976). A DBP é uma proteína de 140 kDa localizada na porção apical do merozoíto nos micronemas (Wertheimer e Barnwell, 1989; Adams *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1992).

Figura 7. Representação esquemática da interação entre a Duffy binding protein (DBP) de *Plasmodium vivax* e o receptor Duffy para quimiocinas (DARC) nos reticulócitos.



Fonte: ajustado de Draper Lab, University of Oxford. Acesso em: <https://draperlab.web.ox.ac.uk/development-vaccines-against-blood-stage-p-vivax>.

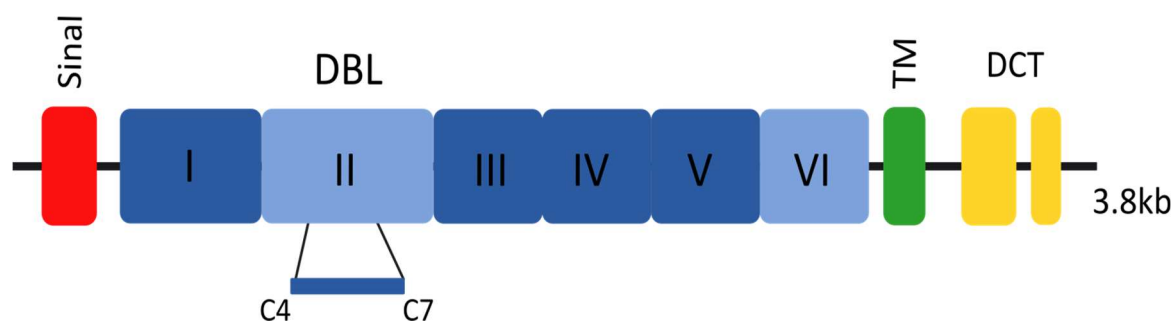
A DBP pertence à família de proteínas homólogas que se ligam aos eritrócitos, conhecida como DBL-EBP (*Duffy binding like-erythrocyte binding protein*), que engloba outras proteínas de micronema. Pode se citar como exemplos (i) PkDBP do parasito do *Plasmodium knowlesi* (Adams *et al.*, 1990), plasmódio simiano que infecta o homem; (ii) EBP2 de *P. vivax* (Hester *et al.*, 2013); e (iii) diferentes proteínas do *P. falciparum*, incluindo a EBA-175, EBA-140/BAEBL (Sim *et al.* 1990; Adams *et al.* 1992; Mayer *et al.*, 2006; Gilberger *et al.*, 2003). Além disso, os membros desta família DBL-EBP compartilham similaridades na estrutura e, com base nessa homologia, foram

definidas seis regiões extracelulares (I-VI), uma região transmembrana tipo I e uma pequena cauda citoplasmática (Adams *et al.*, 1992, 2001). As regiões comuns a todas as EBPs são os dois domínios ricos em cisteína (regiões II e VI) no ectodomínio, com o domínio de ligação ao ligante de eritrócitos na região II (DBP II) (Figura 8).

O domínio de ligação da proteína DBP com o receptor DARC está localizado na região II (DBP II), que corresponde ao domínio *Duffy Binding Like* (DBL). Essa região é composta por 330 aminoácidos caracterizado por um domínio de 12 resíduos de cisteína conservados (Chitnis; Miller, 1994). Este domínio está localizado em um segmento de aproximadamente 170 aminoácidos entre as cisteínas 4 e 7, dentro da região II, sendo ainda subdividida em 3 regiões, conhecidas como subdomínios (SD) 1, 2 e 3, onde o SD2 o principal envolvido na ligação com o receptor DARC (Adams *et al.*, 1992; Ranjan e Chitnis, 1999; Vanbuskirk, *et al.*, 2004a e b; Singh *et al.*, 2006; Sampath *et al.*, 2013).

Figura 8. Representação esquemática dos domínios estruturais da proteína *Duffy Binding Protein* (DBP) de *Plasmodium vivax*.

Os éxons são representados como blocos, sendo que em vermelho está o éxon 1, que codifica uma sequência de sinal de peptídeo; em verde está o éxon 3, que codifica um domínio transmembrana; e em amarelo estão os éxons 4 e 5, que codificam um domínio citoplasmático. O éxon 2, em azul, codifica um grande domínio proteico que contém seis regiões (I a VI). O domínio de ligação aos eritrócitos está na região rica em cisteína (região II), também conhecido como domínio *Duffy Binding Like* (DBL), e os resíduos de ligação críticos foram mapeados para um trecho de 170 aa entre as cisteínas 4-7.



Fonte: ajustado de Sousa *et al.*, 2014.

Devido à importância da DBP II, vários estudos de resposta imune humoral em diversas populações, de diferentes regiões geográficas, inclusive no Brasil, têm sido desenvolvidos (Sousa *et al.*, 2014; Fowkes; Boeuf; Beeson, 2016; Kano *et al.*, 2012; King *et al.*, 2008; Nicolete *et al.*, 2016; Souza-Silva *et al.*, 2014). O padrão de resposta de anticorpos descrito nesses estudos foi que os anticorpos anti-DBP aumentam com

o tempo de exposição ao parasito, idade e o número de episódios prévios de malária (Cole-Tobian *et al.*, 2002; Kano *et al.*, 2012; King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010). Também já foi demonstrado que os anticorpos contra DBP parecem ter tendência para as subclasses citofílicas IgG1 e IgG3 (Tran *et al.* 2005, Maestre *et al.* 2010).

De importância, a exposição prolongada à malária provoca anticorpos específicos para DBP que inibem a ligação de diferentes variantes de DBP-II aos eritrócitos (Ceravolo *et al.* 2008, Souza-Silva *et al.* 2010; King *et al.*, 2008; Nicolette *et al.*, 2016), sendo associada com a proteção clínica contra a doença, incluindo na Amazônia (Nicolette *et al.*, 2016). Os estudos desenvolvidos na Amazônia bem como na Papua-Nova Guiné (PNG) (Oceania), mostraram que a resposta de anticorpos anti-DBP-II, com capacidade de inibir a interação com o seu receptor DARC, foi notavelmente estável ao longo do tempo (King *et al.* 2008, Souza-Silva *et al.* 2010). Esses achados indicam que, uma vez adquiridos, esses anticorpos inibitórios parecem ser estáveis sob exposição contínua à transmissão da malária.

Embora a DBP-II seja o principal antígeno candidato a compor uma vacina contra as formas sanguíneas de *P. vivax* (Revisto por Veiga *et al.*, 2022), a resposta contra esta proteína é do tipo variante-específica. Achados pioneiros do nosso grupo de pesquisa, durante um surto de transmissão autóctone, demonstrou que indivíduos primo-infectados só desenvolviam anticorpos inibitórios contra a variante homóloga, isto é, contra a sequência DBP-II homóloga identificada no isolado do surto (Ceravolo *et al.* 2009). estes achados foram posteriormente confirmados por outros grupos (Chootong *et al.* 2012).

B. Erythrocyte binding protein 2 (EBP2) de *Plasmodium vivax*

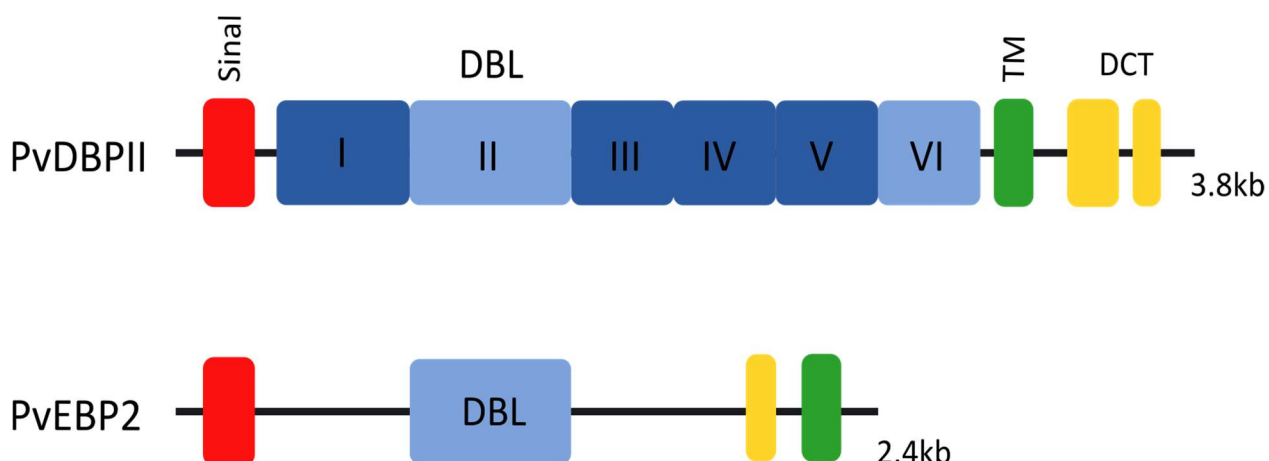
Embora a maioria das variantes de *P. vivax* utilizem a interação DBP/DARC para invadir o reticulócito, estudos recentes têm demonstrado indivíduos que não expressam o receptor DARC na superfície de suas células eritrocitárias, chamados DARC negativos, ainda sim são parasitados por esta espécie (Ryan *et al.*, 2006; Cavasini *et al.*, 2007; Menard *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2015). Esses achados sugerem que este parasito possa utilizar uma via alternativa e ainda desconhecida para invasão dos eritrócitos (Gunalan *et al.*, 2016; revisto por Zimmerman *et al.*, 2013).

Um trabalho publicado por Hester e colaboradores (2013) de remontagem do genoma de *P. vivax*, identificou o gene da *Erythrocyte Binding Protein 2* (EBP2). Esta é uma proteína integrante da família *erythrocyte binding-like* (EBL) identificada no isolado do Camboja (C127) e não identificada anteriormente na cepa referência Salvador-1 (Sal-1).

EBP2 compartilha características importantes dos membros da família de proteínas DBL/EBL, que se caracterizam pelo envolvimento no processo de reconhecimento e invasão dos merozoítos na célula hospedeira (Hadley, 1986; Adams *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1992). Essa proteína possui: i) domínio *Duffy-binding like* (DBL) ou região II, essencial para a invasão dos merozoítos aos eritrócitos; ii) peptídeo sinal; iii) domínio C-terminal rico em cisteínas e; iv) uma porção transmembrana (Figura 9). Além disso, essa proteína é expressa durante o estágio sanguíneo do ciclo do parasito, quando ocorre o processo de invasão dos reticulócitos (Hester *et al.*, 2013).

Figura 9. Representação esquemática comparando os domínios estruturais da proteína *Duffy Binding Protein* (DBP) e da proteína *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) de *Plasmodium vivax*.

Os éxons são representados como blocos, sendo que em vermelho está o éxon 1, que codifica uma sequência de sinal de peptídeo; em verde está o éxon 3, que codifica um domínio transmembrana; e em amarelo estão os éxons 4 e 5, que codificam um domínio citoplasmático. O éxon 2, em azul, codifica um grande domínio proteico que possui uma região rica em cisteína (região II). O domínio de ligação aos eritrócitos está nessa região II, também conhecido como domínio *Duffy Binding Like* (DBL).



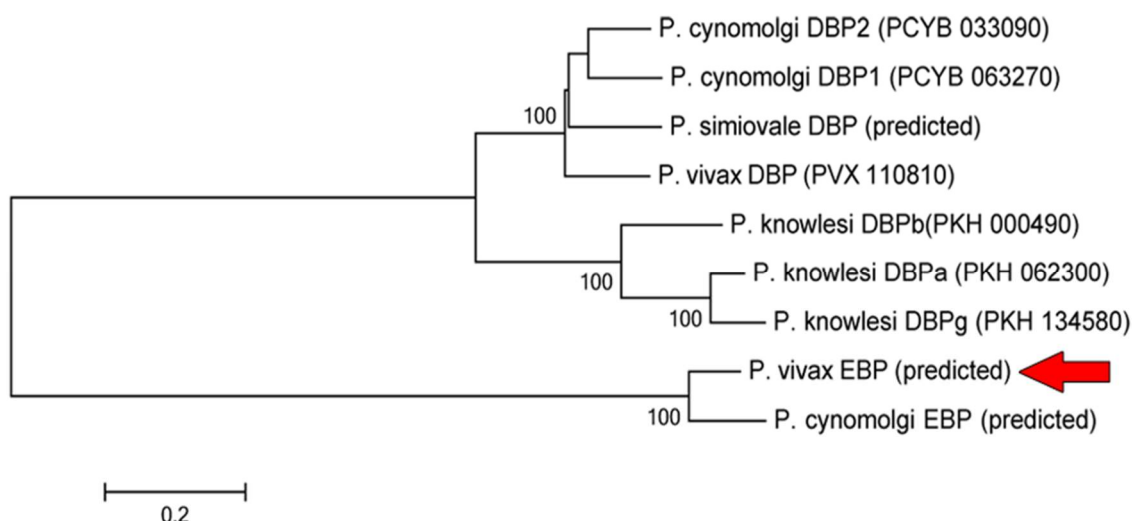
Fonte: ajustado de Lima *et al.*, 2022.

Em análise filogenética, a PvEBP2 se agrupa apenas com uma EBP de *P. cynomolgi* e, portanto, é filogeneticamente diferente da PvDBP de *P. vivax*, como pode

ser observado na figura 10 (Hester et al., 2013). Esses dados demonstram que esta proteína é diferente da maioria das outras DBPs de *Plasmodium* já descritas. Nesse sentido, devido a EBP2 possuir as características chave das proteínas que se ligam ao eritrócito (EBPs) e ser filogeneticamente distinta de DBP de *P. vivax*, tem sido sugerido que ela possa ter uma função distinta da DBP.

Figura 10. Árvore filogenética demonstrando a relação entre as seqüências das proteínas de ligação aos eritrócitos (EBPs) de *P. vivax*, *P. cynomolgi*, *P. simiovale* e *P. knowlesi*.

Indicada pela seta vermelha está a posição da proteína predita *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) de *P. vivax*.



Fonte: Hester et al., 2013.

Em um trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa, verificou-se que a EBP2 se liga preferencialmente a reticulócitos imaturos com alta expressão de CD71 e *Duffy* positivos, com pouca ligação aos reticulócitos *Duffy* negativos (Ntumngia et al., 2016). Estes dados sugerem que esta proteína pode estar envolvida em uma via de invasão alternativa, caracterizada por reticulócitos presentes na medula óssea que possuem alta expressão de CD71. Além disso, vários outros trabalhos levantam a hipótese de que a invasão de merozoítos por *P. vivax* ocorre predominantemente na medula óssea, um importante reservatório dessas células hospedeiras imaturas (Martín-Jaular et al., 2013; Malleret, Renia e Russell, 2017).

O trabalho de Hester e colaboradores, que descreveu esta proteína, mostrou que a região II da EBP2 parece ser menos polimórfica, com apenas 11 polimorfismos de nucleotídeo não sinônimo, quando comparado com a região II da

DBP, que possui 32 SNPs (Hester *et al.*, 2013). Em um recente trabalho publicado pelo nosso grupo (Lima *et al.*, 2022), que avaliou amostras de infecção primária/recorrente de surtos de *P. vivax* em uma área não endêmica, foi identificado uma única substituição de aminoácido, resultante de um polimorfismo de nucleotídeo não sinônimo, no gene da EBP2. O que sugere que essa proteína não é muito variável. Os achados de Roesh e colaboradores (2018) também demonstraram que a EBP2 é pouco polimórfica, quando comparada com a DBPII. Nesse estudo, que utilizou amostras do Camboja e de Madagascar, verificou-se que a *dbpII* apresentou 23 SNPs, por outro lado, onze SNPs foram observados para EBP2, sendo que a maioria deles (59%) era semelhante a referência (C127). Um dos poucos estudos sobre a variabilidade genética do gene que codifica a região II da EBP2 de isolados restritos aos países asiáticos, identificou elevado grau de polimorfismo (Han *et al.*, 2020). Mais estudos em outras regiões geográficas são necessários para avaliar o potencial da EBP2 como candidato vacinal.

Apesar de escassos, os estudos sobre a imunidade naturalmente adquirida à EBP2 demonstraram que ela é antigenicamente distinta da DBPII (domínio DBL/região II da DBP), já que um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que anticorpos anti-DBPII não foram capazes de inibir a ligação da EBP2 em reticulócitos (Ntumngia *et al.*, 2016). Em outro trabalho, um painel composto por 38 antígenos foi avaliado em soros de crianças da Papua-Nova Guiné (PNG), a fim de identificar combinações de proteínas para o desenvolvimento de uma vacina que confira proteção clínica. Esse trabalho mostrou que altos títulos de combinação de anticorpos contra alguns antígenos de *P. vivax* foram associados com potencial efeito protetor (PEP), sendo que a combinação de cinco antígenos (que incluem EBP2 e DBPII) conferiram o PEP maior que 90% (França *et al.*, 2017). A combinação de anticorpos contra EBP2 e DBPII mostraram efeito protetor na redução da malária clínica em até 70% e a resposta de anticorpos anti-EBP2 aumentou positivamente com idade e acúmulo de exposição à malária (He *et al.*, 2019). Essa associação entre exposição e aquisição de anticorpos contra a EBP2 também foi observada em primatas não humanos (PNH) em um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de

pesquisa, em que PNH de vida livre apresentaram maiores frequência e níveis de anticorpos anti-EBP2 quando comparados com PNH de cativeiro (Assis *et al.*, 2021).

Em conjunto, essas características sugerem que esta proteína pode participar de uma via alternativa de invasão dos reticulócitos, e que tem potencial para compor uma vacina contra as formas sanguíneas de *P. vivax*. O presente estudo sobre a variabilidade genética da EBP2 é pioneiro no Brasil e poderá fornecer os subsídios para validar vacinas que visam proteínas mais conservadas que possam induzir uma imunidade de amplo espectro contra diferentes cepas do parasito.

1.3 Vacinas contra os estágios sanguíneos de *Plasmodium vivax*

Atualmente, só existem vacinas contra a malária, aprovadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), contra *P. falciparum*, sendo a Mosquirix (RTS, S/AS01) a principal (RTS, S 2015). Essa é uma vacina de subunidade que tem como alvo as repetições centrais e o C-terminal da proteína de superfície circumsporozoito (CSP - *Circumsporozoite Surface Protein*). A eficácia desta vacina contra a malária clínica ao longo de 4 anos de acompanhamento foi de cerca de 39% (RTS, S, 2015). Porém, com o avanço da idade e tempo de vacinação, a estimativa caiu para níveis mais baixos, chegando à eficácia de apenas cerca de 4% após 7 anos de acompanhamento (Olotu *et al.*, 2016; Laurens, 2020). Apesar das limitações acerca da eficácia, o desenvolvimento dessa vacina representa um avanço enorme no combate da malária, principalmente no continente africano, que é o mais afetado por *P. falciparum*, que leva a alta letalidade e morbidade em crianças menores de 5 anos. No entanto, quando se avalia as vacinas contra a malária causada por *P. vivax*, o cenário de ensaios clínicos ainda é bastante incipiente.

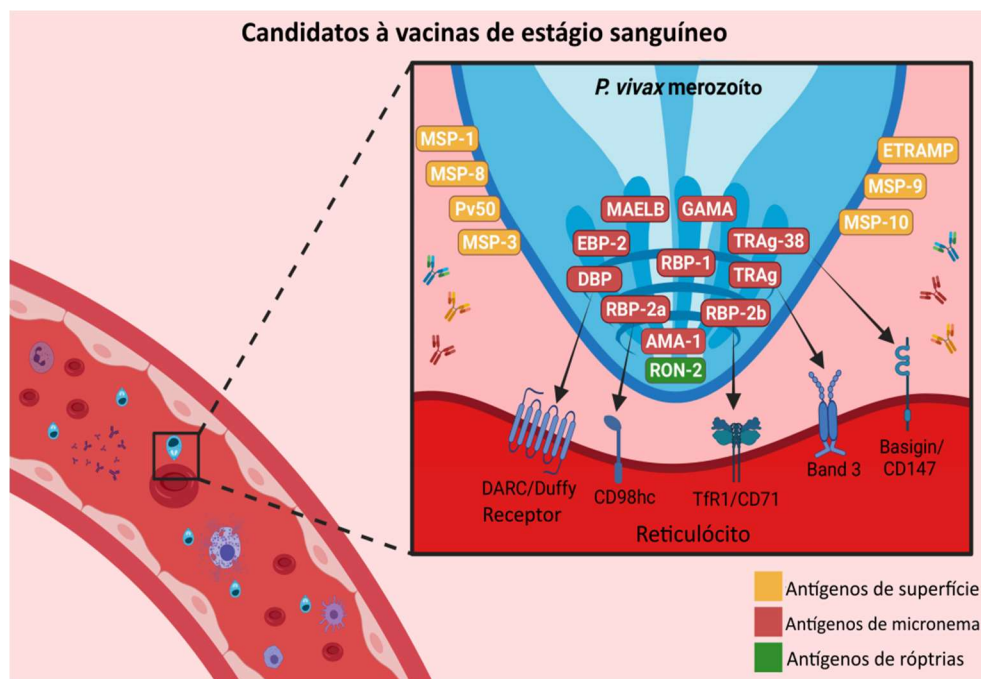
Ainda não existem vacinas licenciadas contra *P. vivax* e, até o momento, somente três antígenos estão nas fases clínicas iniciais, sendo PvCSP, PvDBPII e Pvs25 (para vacinas de estágio pré-eritrocítico, eritrocítico e vacinas bloqueadoras da transmissão, respectivamente) (revisto por López *et al.*, 2017).

As vacinas contra as formas sanguíneas do parasito representam um enorme potencial de bloqueio no desenvolvimento do parasito, uma vez que os merozoítos ficam mais expostos ao sistema imunológico do hospedeiro durante o processo de

invasão dos eritrócitos. Alguns antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax* têm sido estudados como possíveis candidatos à vacina como, família de proteínas RBP, família MSP, RON2, AMA-1, EBP2 e DBPII (Figura 11) (revisto por Da Veiga *et al.*, 2022). No entanto, dentre as vacinas que se encontram em fase de ensaio clínico, a maioria se baseia na PvDBPII, incluindo ChAd63-MVA-PvDBPII (Payne *et al.*, 2017), PvDBPII-GLA-SE (Singh *et al.*, 2018) e PvDBPII/Matrix-M (Hou *et al.*, 2023). No entanto, apesar da importância da PvDBPII, o desenvolvimento de uma vacina baseada somente neste antígeno apresenta algumas limitações, como: i) ser pouco imunogênica (Cole-Tobian *et al.*, 2002); ii) possuir alto polimorfismo que parece crítico para a evasão da resposta imune do hospedeiro (Tsuboi *et al.*, 1994; VanBuskirk *et al.* 2004a) e iii) induzir anticorpos alelo-específicos (Ceravolo *et al.*, 2009). Assim, estudos que visam caracterizar outros antígenos candidatos à vacina, como a família RBP, família MSP, AMA-1 e a proteína recém-descrita EBP2, são importantes para o avanço no combate à malária causada por *P. vivax*.

Figura 11. Desenho esquemático mostrando os principais antígenos candidatos às vacinas de estágio sanguíneo de *Plasmodium vivax*.

Na imagem os antígenos estão organizados de acordo com sua localização no merozoíto: amarelo - antígenos de superfície; verde - antígenos de róptrias; e vermelho - antígenos de micronema.



Fonte: ajustado de Da Veiga *et al.*, 2022.

2. JUSTIFICATIVA

A malária é um grande problema de saúde pública que afeta diferentes regiões do mundo, estando muito associada com a vulnerabilidade socioeconômica dos países mais acometidos por essa doença. No mundo, existem cerca de mais de 400 milhões de casos por ano, sendo *P. vivax* a espécie de maior distribuição global. No Brasil, aproximadamente 99% dos casos de malária ocorrem na região da Amazônia Legal e cerca de 83% são ocasionados por *P. vivax* (SVS/MS, 2022). Apesar dos crescentes avanços nos métodos de controle e vigilância da malária – incluindo no diagnóstico e tratamento –, o desenvolvimento de uma vacina contra a malária causada por *P. vivax* poderia ser uma ferramenta importante visando a eliminação da doença.

Até o momento, não existem vacinas aprovadas contra *P. vivax*. O papel vital da região II da DBP (DBPII) no desenvolvimento do estágio sanguíneo dessa espécie faz com que esta proteína seja um dos principais antígenos candidato a vacina contra as formas sanguíneas (revisto por Da Veiga *et al.*, 2021). Nesse cenário, várias construções baseadas na DBPII encontram-se em fases iniciais de ensaios clínicos e os resultados preliminares destas construções parecem promissores, o que reforça a importância da DBPII como vacina (Payne *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2018 e Hou *et al.*, 2023). No entanto, o desenvolvimento de uma vacina contra a malária baseada somente em DBPII tem sido dificultado pela tendência dessa proteína de induzir respostas imunes do tipo cepa-específica, como descrito pela primeira vez pelo nosso grupo (Ceravolo *et al.*, 2009). Essa característica, pode ser responsável pelo fracasso de muitas vacinas candidatas contra a malária que avançaram para os ensaios clínicos. Outro grande desafio é que está bem estabelecido que *P. vivax* é capaz de estabelecer a infecção em indivíduos *Duffy* negativos (Ryan *et al.*, 2006; Cavasini *et al.*, 2007; Menard *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2015). Esta observação sugere que a infecção de reticulócitos humanos por *P. vivax* não depende exclusivamente da interação ligante DBP e o seu receptor *Duffy* (DARC). Além disso, ainda não foi possível estabelecer *P. vivax* em cultura *in vitro* a longo prazo, o que torna o estudo de antígenos ainda mais desafiador (Grimberg *et al.*, 2007). Assim, se faz necessário o

estudo de outros antígenos de formas sanguíneas do parasito que possam compor uma vacina multi alvos contra *P. vivax*.

A descoberta de uma nova proteína de ligação a eritrócitos (EBP2), que é estruturalmente semelhante a outros DBPs de plasmódio, pode ser a chave para uma via alternativa de invasão. A pesquisa aqui proposta, que visa caracterizar pela primeira vez no Brasil a EBP2 do ponto de vista molecular, é significativa, porque os dados gerados irão avançar nossa compreensão sobre esse antígeno e poderão auxiliar projetos futuros que visem candidatos à vacina contra a malária causada por *P. vivax*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do estudo é caracterizar a variabilidade genética do gene que codifica a *erythrocyte binding protein 2* (EBP2) em isolados de campo de *Plasmodium vivax* da Amazônia brasileira.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a variabilidade genética da região II (domínio DBL) do gene que codifica a *erythrocyte binding protein 2* (EBP2) em parasitos circulantes em áreas endêmicas de malária da Amazônia brasileira;
2. Avaliar comparativamente a variabilidade genética da região II (domínio DBL) do gene que codifica a *Duffy binding protein* (PvDBPII) nas mesmas amostras de campo;
3. Caracterizar a diversidade genética global da região II da EBP2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Declaração de Ética

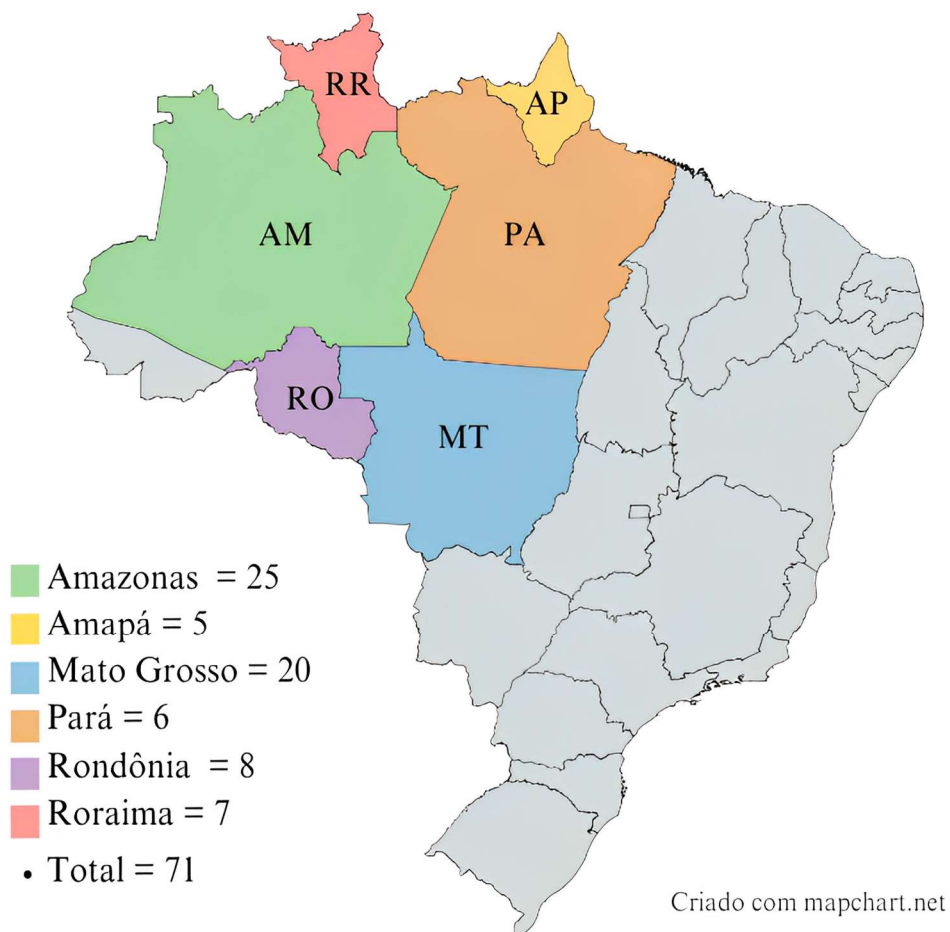
Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas (nº 4.041.859 e CAAE 15632719.0.0000.5091). Todas as amostras foram armazenadas no biorrepositório do Instituto René Rachou - Fiocruz Minas (protocolos nº 07/2006, nº 07/2009, nº 12/2010, nº 26/2013, nº 1.821.955/2016, com curadores Luzia Helena Carvalho e Flora Satiko Kano). Os participantes do estudo foram informados sobre os objetivos e procedimentos do estudo, e sua participação voluntária foi solicitada e confirmada por meio de consentimento formal por escrito.

4.2 População de Estudo

Na região da Amazônia brasileira foram obtidos 71 isolados de campo de *Plasmodium vivax* de pacientes de diferentes estados (Amapá [AP], n = 5; Amazonas [AM] n = 25; Mato Grosso [MT], n = 20; Pará [PA], n = 6, Rondônia [RO], n = 8; Roraima [RR], n = 7) (Fig 12). Os períodos de coletas foram: AP - 2004; AM - 2009, 2015 e 2018; MT - 2003 e 2023; PA - 2005; RO - 2004 e 2023; RR - 2023. As infecções patentes foram confirmadas por análise microscópica em gota espessa corados com *Giemsa* no momento da coleta. Os dados epidemiológicos indicam que a transmissão da malária nestas áreas é geralmente hipo a mesoendêmica (SVS/MS, 2022).

Figura 12. Mapa do Brasil com os isolados de *Plasmodium vivax* sequenciados para a região II da *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2).

Cada cor do mapa indica o estado brasileiro em que 71 amostras foram coletadas, sendo: amarelo - Amapá (AP), n = 5; verde - Amazonas (AM), n = 25; azul - Mato Grosso (MT), n = 20; laranja - Pará (PA), n = 6; roxo - Rondônia (RO), n = 8; vermelho - Roraima (RR), n = 7.



Fonte: mapa criado em <https://www.mapchart.net/>.

4.3 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue total com o kit Puregene Gentra® Blood (Gentra Systems, Minneapolis, EUA), conforme as instruções do fabricante, e armazenado no biorrepositório do Instituto René Rachou - Fiocruz Minas. Resumidamente, foi adicionado 1mL de sangue em um tubo contendo 3mL de tampão de lise de hemácias, essa mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugada à 3500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado de células foi ressuscitado no líquido residual. Em seguida, 1mL de tampão de lise celular foi adicionado e homogeneizado com a amostra. Posteriormente, 330µL de solução de precipitação de proteínas foram

adicionados às células lisadas, homogeneizadas por vórtex e então, centrifugadas à 3500rpm por dez minutos. O precipitado de proteínas foi descartado enquanto o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5mL contendo 1mL de isopropanol puro gelado. A amostra foi homogeneizada por inversão, aproximadamente 50 vezes, e centrifugada à 3500rpm por três minutos. O sobrenadante foi descartado, mantendo o precipitado de DNA, e 1mL de etanol 70% (SIGMA) foi adicionado. A amostra foi, novamente, homogeneizada por inversão a fim de lavar o precipitado de DNA, e centrifugada à 3500rpm por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 15 minutos, com a tampa aberta, para que o etanol evaporasse. Posteriormente, foram adicionados 330µL de água para biologia molecular à amostra, que foi incubada a 65°C durante uma hora seguida de uma incubação a temperatura ambiente overnight. Após o processo as amostras foram refrigeradas à -20°C até o momento do uso.

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizadas diferentes técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região II (domínio DBL) do gene que codifica a *erythrocyte binding protein 2 (EBP2)* e a *Duffy binding protein (DBPII)* nas amostras de DNA de *P. vivax*.

4.4.1 Amplificação da DBPII de *Plasmodium vivax*

As amostras de DNA extraídas foram submetidas a um protocolo de PCR convencional, conforme descrito por Sousa *et al.*, (2006) para amplificação de um fragmento 801pb (nucleotídeos 1010-1810; aminoácidos 337-603) correspondente ao domínio DBL localizado na região II do gene que codifica a *Duffy binding protein (DBPII)*. Os *primers* utilizados foram: sentido (*forward*) – TTTCTCGAGACGATCTCTAGTGCTATTATAAATC e anti-senso (*reverse*) – AAAGGATCCTGTCACAACTTCCTGAGTATTTTT. O isolado de campo Sal-1 (número de acesso: M61095) foi usado como referência para projetar os primers (Fang, *et al.*, 1991). As reações de PCR foram realizadas em volumes de 20µL contendo 2µL da amostra de DNA (100-200ng), 1µL de cada iniciador 10mM, 1,0µL de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1,25mM, 0,6µL MgCl₂ 50mM, 0,4µL da enzima DNA polimerase 1U (1:10) (Invitrogen, California, USA), 2µL de tampão 10X

fornecido com a enzima e 12,2µl de água ultrapura (tabela 1). Foi feita uma diluição 1:10 com a DNA polimerase Platinum Taq de alta fidelidade (1µL), que reduz a incorporação incorreta de nucleotídeos, e Taq DNA polimerase (9µL).

As amplificações foram conduzidas em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*) e as condições foram um ciclo de 3 minutos a 94°C para desnaturação do DNA, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C para anelamento dos iniciadores, 1:00 minuto a 72°C para extensão da sequência, e finalmente um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C (tabela 4). Além disso, foram adicionados controles negativos (contendo água ao invés de DNA) em cada uma das reações.

Tabela 1. Reagentes utilizados na reação de PCR convencional para amplificação do domínio DBL do gene que codifica a *Duffy binding protein* (DBPII) de *Plasmodium vivax*.

Componentes	Concentração estoque	Concentração final
Água	-	-
Solução de dNTP	25mM	1,25mM
Primer Sense (Forward)	100mM	10mM
Primer antisense (Reverse)	100mM	10mM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	50mM	50Mm
Tampão Buffer	10x	10x
Taq DNA Polymerase e Taq High Fidelity	1:10	1:10

Tabela 2. Ciclo no termociclador utilizado na reação de PCR convencional para amplificação do domínio DBL do gene que codifica a *Duffy binding protein* (DBPII) de *Plasmodium vivax*.

Ciclo no Termociclador		
Temperatura	Tempo	Repetição
94°C	3 min	1x
94°C	30 seg	35 vezes
58°C	30 seg	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1x
4°C	-	1x

Para confirmar a amplificação do DNA no tamanho correto em pares de bases, foi realizada uma corrida de eletroforese em gel de agarose. Para isso, foi preparada uma solução de 1% de agarose tampão TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA) em um erlenmeyer. O gel foi derretido em forno micro-ondas. Após resfriamento, foi adicionado brometo de etídio (para corar o DNA) e o gel foi despejado na placa molde. Foi colocado um pente para a formação das canaletas. Após a formação das canaletas e a polimerização do gel, o pente foi retirado e o gel foi introduzido na cuba de eletroforese. Tampão TAE 1X adicionado na cuba até cobrir todo o gel. Foram misturados 4 μ L do *amplicon* obtido após reação de PCR e 2 μ L de corante Orange concentração 5x e, posteriormente, depositados nos poços do gel de agarose. O gel foi submetido a uma eletroforese com voltagem de 90 volts por 40 minutos. Ao final da corrida, o gel foi transferido para um transluminador com luz ultravioleta para que as bandas dos fragmentos de DNA fossem visualizadas e fotodocumentadas.

4.4.2 Amplificação da EBP2 de *Plasmodium vivax*

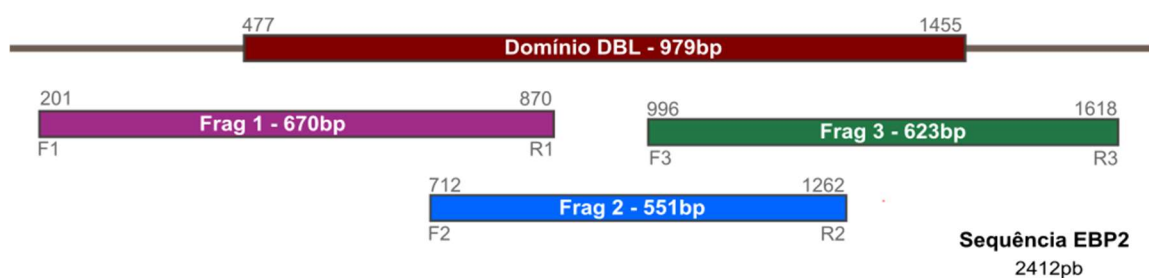
Foram conduzidos protocolos de Nested PCR (PCR aninhado) e Semi-Nested PCR (PCR semi-aninhado) com o objetivo de amplificar um fragmento de 979pb (nucleotídeos 477-1455; aminoácidos 159-485) correspondente ao domínio DBL localizado na região II do gene que codifica a *erythrocyte binding protein 2*

(EBP2). Essas técnicas envolvem dois conjuntos de primers, usados em duas execuções sucessivas de PCR, com o segundo conjunto destinado a amplificar um alvo secundário dentro do produto da primeira execução. A seguir, apresentaremos uma descrição detalhada desses protocolos.

Além disso, para cobrir o domínio DBL (979 pb) e ter uma alta qualidade dos dados da sequência, três conjuntos de primers sobrepostos foram projetados para a amplificação e sequenciamento, conforme descrito por Lima *et al.* (2022). Essa etapa foi extremamente importante, pois o método de sequenciamento de Sanger é otimizado para produzir sequências com até 900 pares de base de comprimento. Os conjuntos de primers cobrem uma região além do domínio DBL, correspondendo aos nucleotídeos 201 a 1618 (aa 68–535) (Fig 13). O isolado de campo cambojano (C127) (número de acesso: KC987954) foi usado como referência para projetar os primers (Hester, *et al.* 2013).

Figura 13. Representação esquemática dos iniciadores desenhados para amplificação e sequenciamento do domínio DBL do gene que codifica a *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) de *Plasmodium vivax*.

Foram desenhados três pares de iniciadores que amplificaram três fragmentos complementares. Cada fragmento está representado com os respectivos pares de oligonucleotídeos iniciadores senso (Forward) e anti-senso (Reverse) nas cores correspondentes, sendo: Fragmento 1 em rosa (201-870pb), Fragmento 2 em azul (posição 717-1262pb) e Fragmento 3 em verde (996-1618pb).



Fonte: ajustado de Lima *et al.*, 2022.

Primeira reação de amplificação

Uma primeira rodada de PCR foi realizada usando DNA como molde e os conjuntos de primers foram: fragmento 1 senso (*forward*) (F1: 5'-AGAAATAAGAAAAGAGCAGTAG-3') e fragmento 3 anti-senso (*reverse*) (R3: 5'-CTCTTCCTTTACTCTTCCCA-3'). As reações foram realizadas conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo (Lima, *et al.*, 2022), em volumes de 20µl contendo 2µL da amostra de DNA (100-200ng), 1µL de cada iniciador 10mM, 3,2µL de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1,25mM, 0,6µL MgCl₂ 50mM, 0,4µL da enzima DNA

polimerase Platinum Taq de alta fidelidade 1U/ μ L (Invitrogen, California, USA), 2 μ L de tampão 10X fornecido com a enzima e 9,8 μ L de água ultrapura (tabela 3). Foi feita uma diluição 1:10 com a DNA polimerase Platinum Taq de alta fidelidade (1 μ L), que reduz a incorporação incorreta de nucleotídeos, e DNA polimerase (9 μ L).

As amplificações foram conduzidas em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*) e as condições foram um ciclo de 5 minutos a 95°C para desnaturação do DNA, seguido por 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 58°C para anelamento dos iniciadores, 1:30 minuto a 72°C para extensão da sequência, e finalmente um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C (tabela 4). Além disso, foram adicionados controles negativos (contendo água ao invés de DNA) em cada uma das reações.

Tabela 3. Reagentes utilizados na reação de amplificação do domínio DBL do gene que codifica a *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) de *Plasmodium vivax*.

Componentes	Concentração estoque	Concentração final
Água	-	-
Solução de dNTP	25mM	1,25mM
Primer Sense (Forward)	100mM	10mM
Primer antisense (Reverse)	100mM	10mM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	50mM	50Mm
Tampão Buffer	10x	10x
Taq DNA Polymerase e Taq High Fidelity	1:10	1:10

Tabela 4. Ciclo no termociclador utilizado na reação de amplificação do domínio DBL do gene que codifica a *Erythrocyte binding protein 2 (EBP2)* de *Plasmodium vivax*.

Ciclo no Termociclador		
Temperatura	Tempo	Repetição
95°C	5 min	1x
95°C	40 seg	35 vezes
58°C	40 seg	
72°C	1:30 min	
72°C	4 min	1x
4°C	-	1x

Posteriormente, foi realizada uma diluição (1:10) com o amplicon gerado nessa primeira rodada de amplificação, sendo utilizados 1µL de amplicon e 9µL de água. Essa etapa foi necessária para evitar a amplificação de fragmentos inespecíficos de DNA na segunda rodada de amplificação, tendo em vista que reação de Nested e Semi-Nested PCR geram grandes quantidades de DNA.

Segunda reação de amplificação

Os primers usados na primeira rodada de amplificação foram ambos substituídos para o segundo ciclo e subsequentes amplificação do fragmento 2, o que caracteriza uma reação de Nested PCR. Por outro lado, para os fragmentos 1 e 3 apenas um *primer* foi substituído para o segundo ciclo, sendo uma reação de Semi-Nested PCR. Os conjuntos de primers foram: fragmento 1 (F1: 5'-AGAAATAAGAAAAAGAGCAGTAG-3') e (R1: 5'-ATTTCCATGCGCCACGATG-3'); (F2: 5'-CAAGTCCTTCTTTCACTAAAC-3') e (R2: 5'-GTATCCCATTGCTCCTTCTTTA-3') e fragmento 3 (F3: 5'-AGGTAAAGGCAAAGAAGGCA-3') e (R3: 5'-CTCTTCCTTTACTCTCTCCA-3') (Tabela5). A polimerase de DNA Taq de platina de alta fidelidade (*Invitrogen Corporation*, Carlsbad, CA) foi usada em ambas as reações para reduzir a possível incorporação incorreta de nucleotídeos.

Tabela 5. Pares de oligonucleotídeos iniciadores senso (*Forward*) e anti-senso (*Reverse*) desenhados para amplificação e sequenciamento do domínio DBL do gene que codifica a *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) de *Plasmodium vivax*.

Iniciador (<i>Primer</i>)	Sequência (5' → 3')	Amplicon (pb)	Rodada de Amplificação
EBP2/DBL - Forward	AGAAATAAGAAAAAGAGCAGTAG	979pb	1° reação
EBP2/DBL - Reverse	CTCTTCCTTTACTCTCTCCA		
Frag 1 - Forward	AGAAATAAGAAAAAGAGCAGTAG	670pb	2° Reação - Fragmento 1
Frag 1 - Reverse	ATTTCCATGCGCCACGATG		
Frag 2 - Forward	CAAGTCCTTCTTTCACTAAAC	551pb	2° Reação - Fragmento 2
Frag 2 - Reverse	GTATCCCATTGCTCCTTCTTTA		
Frag 3 - Forward	AGGTAAAGGCAAAGAAGGCA	623pb	2° Reação - Fragmento 3
Frag 3 - Reverse	CTCTTCCTTTACTCTCTCCA		

As reações foram realizadas em volumes de 20µl, com os demais reagentes na mesma concentração e quantidade descrita anteriormente. No entanto, foi utilizado 1µL de *amplicon* ao invés de 2µL de DNA, e a água ultrapura foi aumentada em 1µL para completar o volume da reação. Foram adicionados controles negativos (contendo água) em cada uma das reações. As amplificações foram conduzidas em termociclador conforme descrito anteriormente (tabela 4).

Para confirmar a amplificação dos produtos no tamanho correto em pares de bases, retirou-se 6µL de cada tubo de amostra diluí-se em 2µL do corante Orange na concentração 5x e aplicou-se em gel de agarose 1% (Gibco, EUA), diluído em TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA) contendo 0,8 mg/ml de brometo de etídeo (Invitrogen, CA, EUA). Foi adicionado um padrão de peso molecular (1Kb plus) na primeira canaleta do gel. O gel foi submetido a uma eletroforese com voltagem de 90 volts por 40 minutos. Ao final da corrida, o gel foi transferido para um transluminador com luz ultravioleta para que as bandas dos fragmentos de DNA fossem visualizadas e fotodocumentadas.

Os produtos resultantes da segunda rodada de amplificação também foram novamente diluídos em água. Primeiramente, foi realizada a dosagem dos

amplicons no nanodrop (NanoDrop™ Thermo Fisher Scientific) para obter a concentração de DNA em ng/μL. Posteriormente, a diluição foi calculada conforme as recomendações indicadas para o sequenciamento de Sanger, que sugerem o uso de 2 ng de DNA para cada 100 pb. Dessa forma, como os três fragmentos correspondentes ao domínio DBL possuem em média 600 pb, utilizamos cerca de 12 ng de DNA. Para confirmar a amplificação do DNA no tamanho correto em pares de bases, foi realizada uma corrida de eletroforese em gel de agarose conforme explicado no tópico 4.4.1.

4.5 Purificação e Sequenciamento de Sanger

As amostras amplificadas no tamanho correto, verificado no gel de agarose, foram purificadas por meio da utilização da enzima ExoSAP-IT (Affymetrix® - Product Numbers 78200/01/02/05), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante: em um tubo foi adicionado 2μl da enzima ExoSAP-IT e 5μl do produto da PCR. Esta amostra era incubada à 37°C por 10 minutos (nesta etapa ocorre a degradação dos primers e dos nucleotídeos restantes) e depois à 80°C por 15 minutos (desnaturação da enzima). Após a purificação, foi conduzida a reação de sequenciamento baseado no método de terminação de cadeia com ddNTPs (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977).

As reações de sequenciamento foram feitas em um volume final de 10μl contendo 1μl de *amplicon* purificado (cerca de 100ng), 0,5μl dos mesmos iniciadores utilizados na PCR, 0,5μl de BigDye Terminator v3.1 (*Applied Biosystems* - Life Technologies) contendo enzima, dNTPs e ddNTPs; 1μl do tampão 5X fornecido com o BigDye e 7μl de água ultrapura. As reações foram conduzidas em termociclador Veriti com um ciclo de 1min a 96°C, seguido por 35 ciclos de 15seg a 96°C, 15seg a 57°C, e 4 min a 60°C. O DNA foi precipitado adicionando 1μl de EDTA a 125mM, 1μl de acetato de sódio a 3M e 50μl de etanol absoluto 100%. O homogeneizado foi incubado por 15min a 25°C protegido da luz e depois centrifugado a 3700rpm por 45 min a 25°C. O sobrenadante foi removido por inversão da placa e o sedimento lavado com 100μl de etanol 70%. Após descarte do excesso de álcool, a placa foi centrifugada a 3700rpm por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e o restante do álcool deixado evaporar por cerca de 10min à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em

10µl de tampão contendo 70% formamida e 1mM EDTA e armazenado a 4°C. Posteriormente, a placa foi analisada por meio de eletroforese capilar utilizando o analisador de DNA ABI 3730xL (Applied Biosystems).

4.6 Análise de dados

4.6.1 Análise dos Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)

As sequências foram alinhadas, comparadas e editadas usando o algoritmo de alinhamento múltiplo *ClustalW* no software BioEdit Sequence Alignment, com edição manual (Hall, 1999), para identificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). As sequências referências para *ebp2* e *dbpII* foram C127 (acesso: K987954.1) e Sal-1 (acesso: M61095.1), respectivamente. A qualidade e confiabilidade das sequências foram avaliadas com base nos eletroferogramas de cada sequência no software Chromas 2.4 (Technelysium©). Os *gaps* foram removidos dos alinhamentos. Um total de seis *reads* de cada fragmento foi usado para alinhamento e construção da sequência contig para *ebp2* e dois *reads* para *dbpII*.

4.6.2 Diversidade Genética e testes de neutralidade

Para estimar a diversidade genética intrapopulacional foi utilizado o software DnaSP Sequence Polymorphism DnaSP v5.1 (Rozas et al., 2017). Os índices avaliados foram: número de sítios segregantes (S); número de haplótipos (H); diversidade de nucleotídeos (π), que varia conforme o tamanho da amostra e do comprimento das sequências; diversidade de haplótipos (H_d) e seus correspondentes desvios padrão (SDs). A diversidade de nucleotídeos pode ser definida como o número médio de diferenças nucleotídicas entre quaisquer duas sequências amostradas aleatoriamente em uma população, e a diversidade de haplótipos pode ser definida como a probabilidade de amostrar aleatoriamente dois haplótipos distintos em uma população, ambos foram calculados de acordo com Nei (1987).

A diferenciação genética entre as populações de parasitos dos países Camboja, Madagascar, Mianmar, Papua Nova Guiné, Coreia do Sul, Tailândia, Vietnã e Brasil foi medida a partir da estimativa do índice de fixação (F_{ST}) (Wright,

1978). O índice F_{ST} de Wright representa uma medida do grau de diferenciação genética interpopulacional (Slatkin, 1993). Os softwares Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer, 2010) e DnaSP Sequence Polymorphism v5.1 (Rozas et al., 2017) foram utilizados para as análises. Segundo Wright (1978), valores entre 0 e 0,05 indicam pouca diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação moderada, entre 0,15 e 0,25, alta diferenciação e valores acima de 0,25 representariam diferenciação genética muito alta.

Para testar a expansão populacional passada e forças evolutivas podem estar envolvidas nas alterações das frequências alélicas e haplotípicas e, portanto, na variabilidade genética, realizaram-se três testes de neutralidade: o teste D de Tajima (Tajima, 1989) e os testes F^* e D^* de seletividade neutra (Fu & Li, 1993). O teste D de Tajima tem o objetivo de identificar sequências que não se encaixam no modelo da teoria neutra da evolução molecular de Kimura et al (1968), ou seja, distinguir entre uma sequência de DNA evoluindo aleatoriamente (neutra) e uma evoluindo sob um processo não aleatório. Os valores negativos indicam um excesso de polimorfismos de baixa frequência (raros) em comparação com o que seria esperado sob um modelo neutro de evolução. Por outro lado, valores positivos para D de Tajima indicam baixos níveis de polimorfismos de alta e baixa frequência em comparação com o que seria esperado sob um modelo neutro de evolução. Os testes F^* e D^* de seletividade neutra (Fu & Li, 1993), se baseiam na distribuição de haplótipos. Os valores negativos indicam que há um excesso de mutações raras nas populações em relação ao que seria esperado sob neutralidade e os valores positivos, que há baixos níveis de mutações de alta e baixa frequência. Todos os testes foram realizados no programa DnaSP Sequence Polymorphism DnaSP v5.1 (Rozas et al., 2017).

4.6.3 Modelagem Molecular

A modelagem computacional da estrutura tridimensional da EBP2 foi feita no *Swiss Model* a partir da sequência de aminoácidos. Identificamos um *template* com identidade da sequência de 99,63% com a EBP2 (código de acesso: A0A1G4EC92.1. A) e ele foi utilizado como molde. As marcações das mutações de aminoácidos foram feitas no programa PyMOL versão 2.5.5. (Wijeyesakere et al., 2007).

4.6.4 Análises das sequências de EBP2 disponíveis na literatura

Análises adicionais foram conduzidas utilizando 352 sequências do gene que codifica a região II da *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2), que se encontravam disponíveis no banco de dados do GenBank® no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (dados atualizados até 08 de setembro de 2023). Esse conjunto de dados incluiu isolados de *P. vivax* coletados em várias áreas endêmicas para malária em todo o mundo: Camboja, n = 150 e Madagascar, n = 69 (Roesh *et al.*, 2018); Mianmar, n = 10; Papua-Nova Guiné, n = 16; Coreia do Sul, n = 10; Tailândia e n = 72; Vietnã, n = 25 (Han *et al.*, 2020).

As 423 sequências foram alinhadas (352 sequências globais e 71 do Brasil) e comparadas com a sequência cambojana C127, referência para o gene *ebp2* (acesso: K987954.1). Foram realizadas análises de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), de diversidade genética e testes de neutralidade, explicados anteriormente.

5. RESULTADOS

5.1 Comparação entre as técnicas de amplificação para EBP2

A correta amplificação da região II (domínio DBL) da EBP2 foi verificada por meio de uma eletroforese com gel de agarose (1%) (Figura 14). Inicialmente, observou-se que apenas 12 amostras (n = 15%), de um total de 78, foram amplificadas com sucesso para a região II da *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) ao utilizar um protocolo de PCR convencional. Em um primeiro momento, para confirmar se era um problema da técnica ou uma deleção desse gene em grande parte das amostras do estudo, novos protocolos de amplificação foram adaptados. De forma muito interessante, após a utilização de Nested PCR e Semi-Nested PCR, que são protocolos mais sensíveis, observou-se que as amostras que não haviam amplificado na PCR convencional, passaram a amplificar (Figura 15). Todas as amostras testadas (n = 71) para a região II da *ebp2* amplificaram com os novos protocolos, o que aponta uma alta prevalência desse gene nas amostras de *P. vivax* circulantes de áreas endêmicas para malária no Brasil.

Resultados

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose do *ebp2* de *Plasmodium vivax*.

A) Primeira rodada de amplificação do domínio DBL (979pb): a canaleta 1 corresponde ao marcador molecular de 1Kb plus DNA Ladder, as canaletas 2 a 7 correspondem ao domínio DBL e a canaleta 8 corresponde ao branco ou controle negativo (água). **B)** Segunda rodada de amplificação do fragmento 1 (670pb) por Nested PCR: a primeira canaleta corresponde ao marcador molecular de 1Kb plus, as canaletas 1 a 4 correspondem ao fragmento e a canaletas 5 corresponde ao controle negativo (água). **C)** Segunda rodada de amplificação do fragmento 2 (551pb) por Semi-nested PCR: a primeira canaleta corresponde ao marcador molecular de 1Kb plus, as canaletas 1 a 15 correspondem ao fragmento 2 e a canaleta 16 corresponde ao controle negativo (água) da reação. **D)** Segunda rodada de amplificação do fragmento 3 (623pb) por Nested PCR: a primeira canaleta corresponde ao marcador molecular de 1Kb plus, as canaletas 1 a 4 correspondem ao fragmento 3 e a canaletas 5 corresponde ao controle negativo (água).

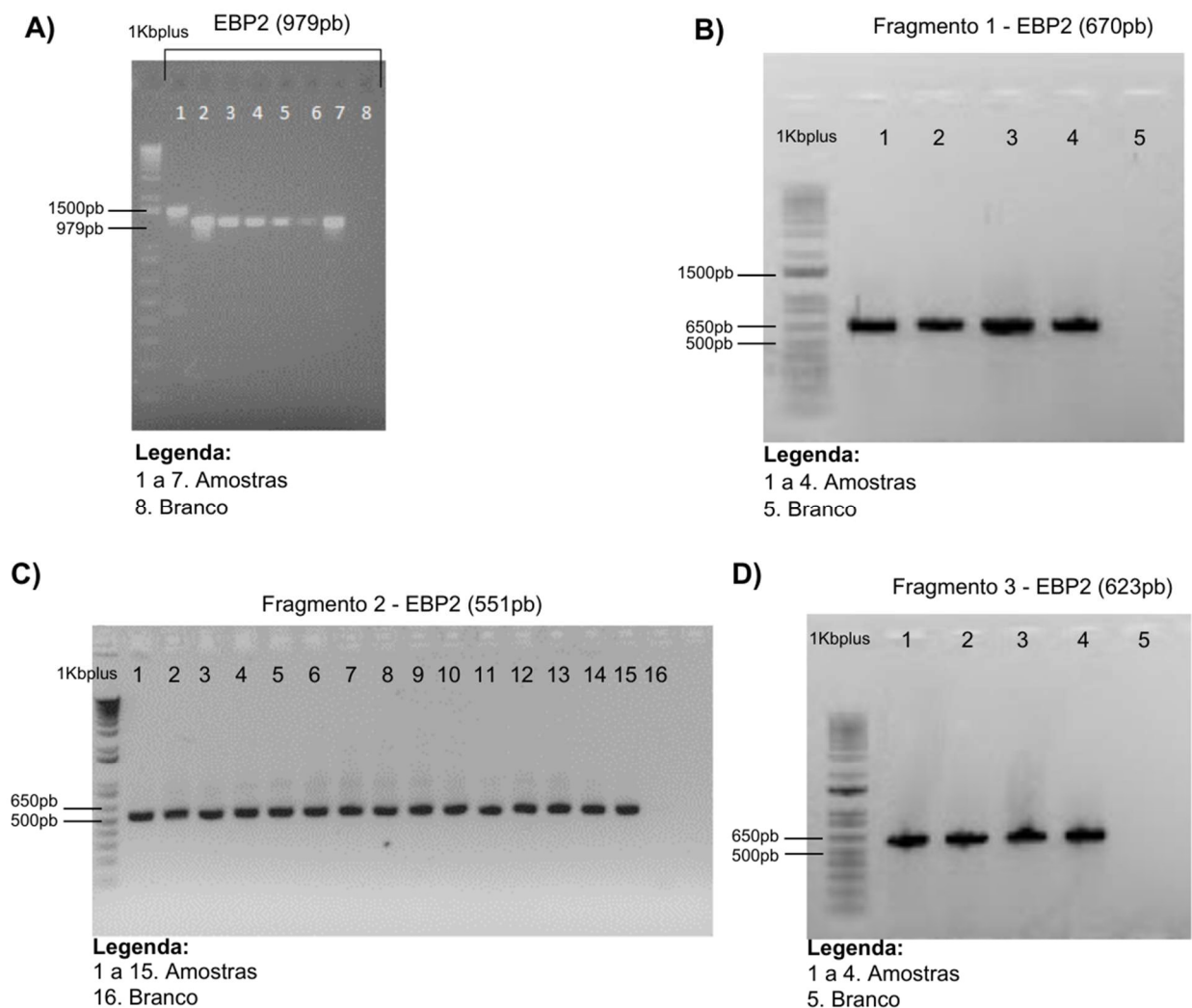
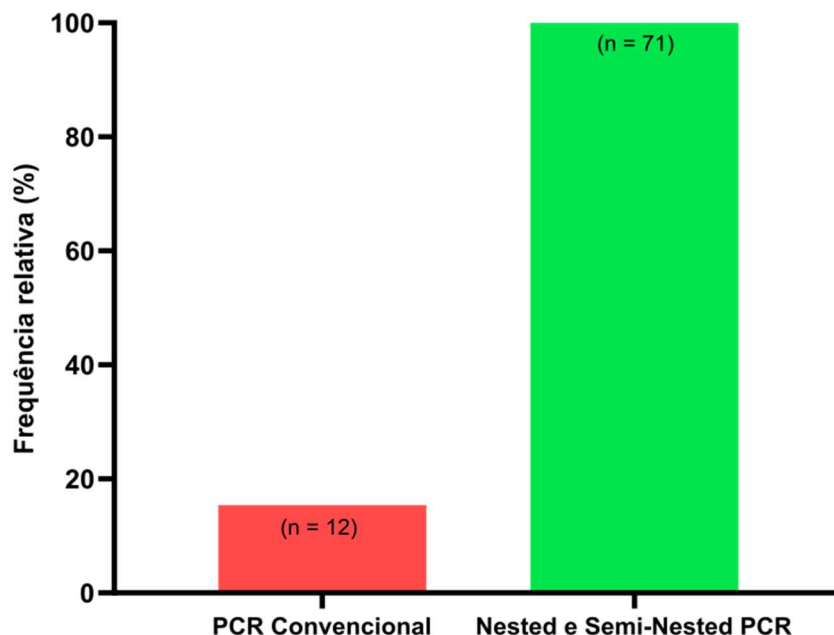


Figura 15. Número de amostras amplificadas para a região II da *Erythrocyte binding protein 2 (EBP2)* de *Plasmodium vivax*.

De 78 amostras testadas, apenas 15,4% (n = 12) amplificaram com o protocolo de PCR convencional. Com a mudança do protocolo para Nested e Semi-Nested PCR, 71 amostras testadas amplificaram com sucesso.



5.2 Variabilidade genética da EBP2 em parasitos circulantes em áreas endêmicas para malária no Brasil

5.2.1 Diversidade genética da região II da EBP2

O sequenciamento do domínio DBL localizado na região II da *erythrocyte binding protein 2* (EBP2) (198–1620pb) foi realizado com sucesso em 71 amostras. O eletroferograma de cada sequência foi analisado no software Chromas 2.4 e as sequências apresentaram uma qualidade elevada. A figura 16 ilustra uma destas sequências amplificadas. Doze polimorfismos de base única (SNP - *Single nucleotide polymorphisms*) foram identificados nas amostras do Brasil quando comparamos com a sequência referência disponível no GenBank (acesso: KC987954). Esses SNPs geraram 15 haplótipos diferentes (Figura 17). O haplótipo correspondente ao isolado de referência (C127) apareceu em todos os estados, exceto no Amapá. É importante ressaltar que foram apenas 5 amostras desse estado, o que pode ter influenciado neste achado. Os haplótipos

Resultados

2, 3, 4, 5 e 6 apareceram em amostras de três dos 6 estados avaliados. Os demais haplótipos apareceram em apenas um ou dois estados (Figura 18).

Figura 16. Eletroferograma parcial da sequência de DNA da região II da *Erythrocyte binding protein 2 (EBP2)* de *Plasmodium vivax*.

A figura ilustra uma sequência que foi analisada pelo software Chromas 2.4 e gerada pelo analisador de DNA ABI 3730xL. Os quadrados acima das bases nitrogenadas (adenina [A]; timina [T]; citosina [C] e guanina [G]) estão bem preenchidos e não há sobreposição entre os picos do gráfico, isso indica uma alta qualidade da sequência e confiabilidade do resultado. Esse padrão de eletroferograma foi observado na maioria das sequências de *ebp2*.

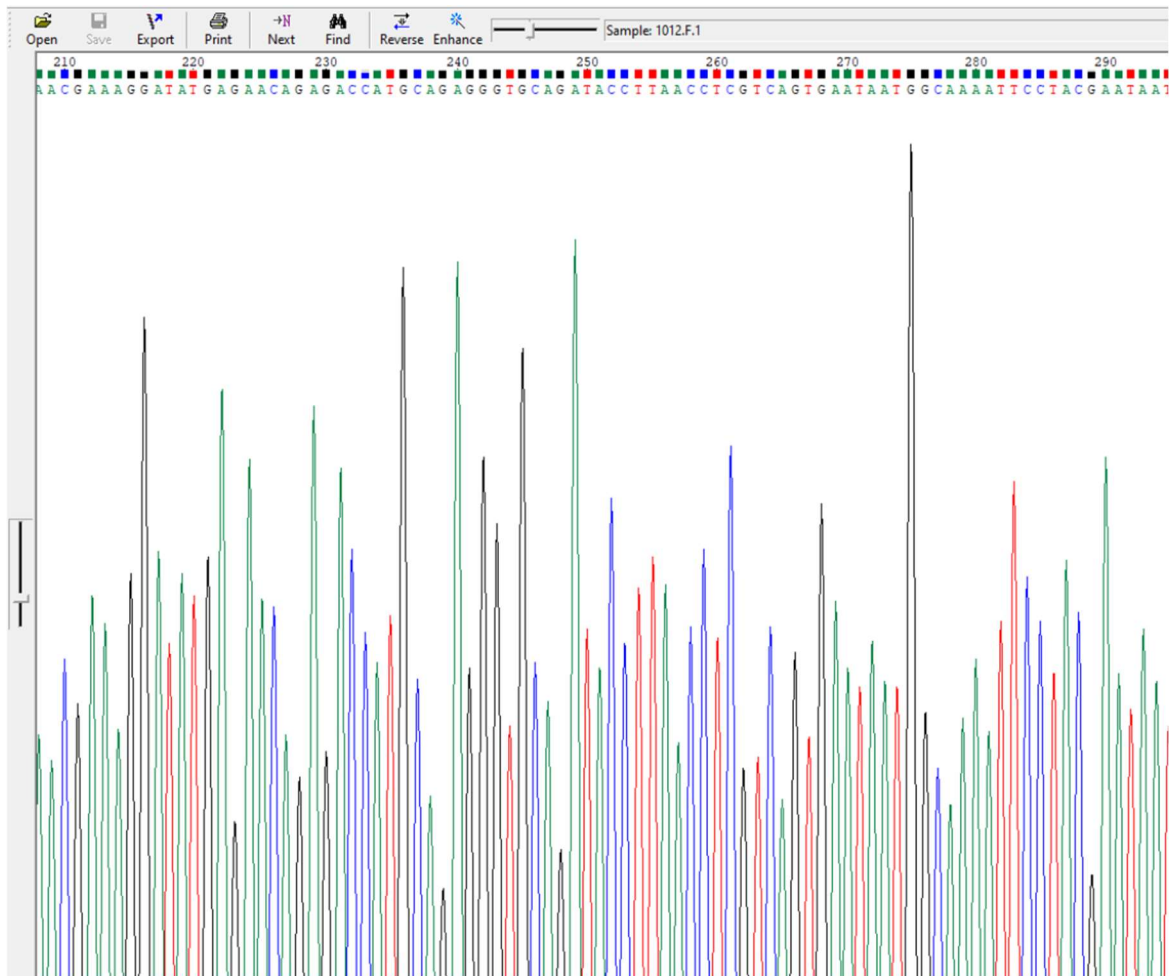


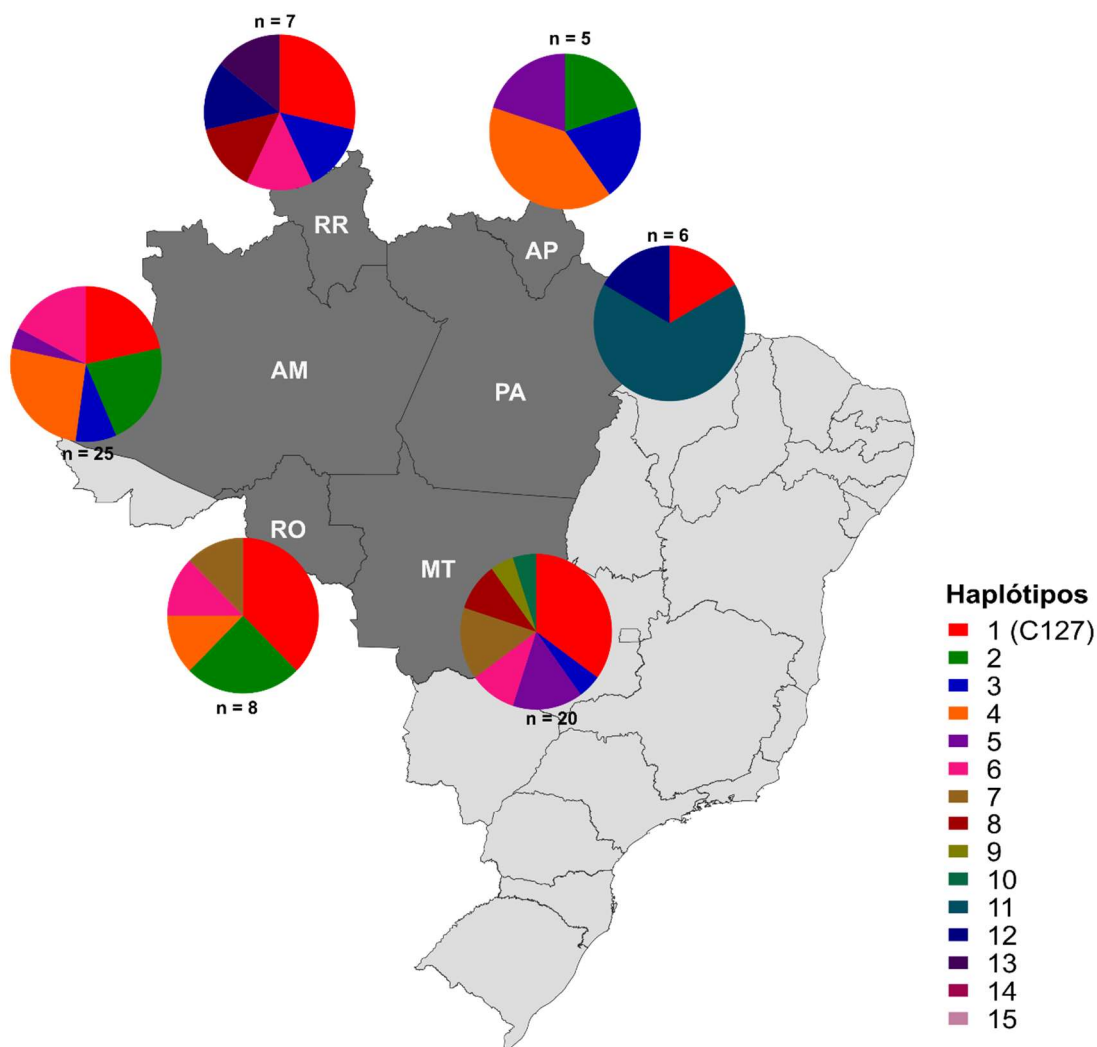
Figura 17. Haplótipos representando a região II da EBP2 de *P. vivax* em 71 amostras da Amazônia brasileira.

A sequência de referência C127 (Hester et al., 2013) corresponde ao haplótipo 1. Cada linha representa a sequência de cada um dos haplótipos (1 a 15), seguida da frequência detectada nas amostras estudadas (n, %). As diferentes cores representam as bases nitrogenadas (adenina [A]; timina [T]; citosina [C] e guanina [G]). O número abaixo de cada coluna representa a posição do polimorfismo de base única (SNP).

		Haplótipos EBP2						Frequência							
								n	%						
(C127)	1	G	T	T	T	G	G	G	G	G	T	A	G	18	25
	2	G	T	T	T	G	G	G	G	A	T	A	G	8	11
	3	G	T	T	T	G	G	G	A	G	T	A	G	5	7
	4	T	T	A	T	G	G	G	G	G	T	A	G	9	19
	5	G	A	T	T	G	G	G	G	G	T	A	G	5	7
	6	G	A	T	T	G	A	G	G	G	T	A	G	8	11
	7	G	T	T	T	A	G	A	G	G	T	A	G	4	6
	8	T	A	T	T	G	G	G	G	G	T	A	G	3	4
	9	T	A	T	T	G	A	G	G	G	T	A	G	1	1,4
	10	T	T	A	T	G	A	G	G	G	T	A	G	1	1,4
	11	G	T	T	A	G	G	A	G	G	T	A	G	4	6
	12	G	T	A	T	G	G	G	A	G	T	A	G	2	3
	13	G	T	T	T	G	G	G	G	A	T	A	C	1	1,4
	14	G	T	T	T	G	G	A	G	G	T	G	G	1	1,4
	15	G	T	T	T	G	G	A	G	G	G	A	G	1	1,4
		442	600	655	699	802	907	931	964	1057	1370	1387	1484		

Figura 18. Mapa mostrando a distribuição e frequência por região amazônica dos haplótipos EBP2 (região II).

As frequências de 15 haplótipos com base nas 12 mutações de aminoácidos não sinônimas no EBP2 são representadas como gráficos de pizza e cada cor representa um haplótipo. A sequência de referência cambojana C127 (Hester et al., 2013) corresponde ao haplótipo 1 (em vermelho). Os haplótipos identificados foram distribuídos pelos seis estados da região amazônica (RR: Roraima, RO: Rondônia, PA: Pará, MT: Mato Grosso, AM: Amazonas e AP: Amapá).



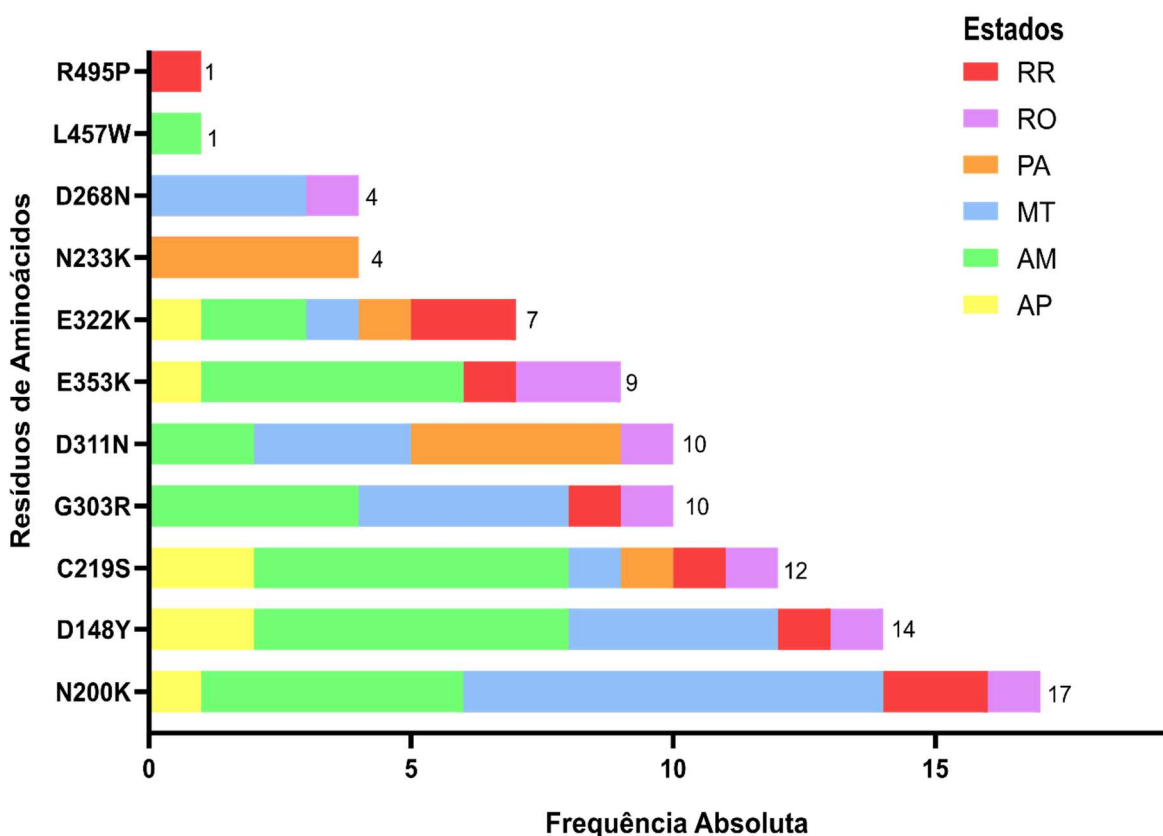
Mapa criado em <https://www.mapchart.net/>.

Quando avaliamos os doze SNPs, onze corresponderam as substituições não-sinônimas (nsSNP - *Non-synonymous single nucleotide polymorphisms*), ou seja, com alteração do aminoácido (Figura 19). Uma única substituição não correspondeu a troca de aminoácido (sinônima; sSNP - *synonymous single nucleotide polymorphisms*). A maioria das substituições detectadas estavam

presentes em várias amostras, como a troca de uma Asparagina (N) por uma Lisina (K) na posição 200 (N200K) em 17 amostras, seguido por D148Y e C219S em 12 amostras, G303R e D311N em 10 amostras, E353K em 9 amostras, E322K em 7 amostras. N233K e D268N foram encontrados em 4 amostras e L457W e R495P foram únicas, sendo detectadas em apenas uma sequência (Figura 19).

Figura 19. Descrição dos polimorfismos não-sinônimos (nsSNPs) para a região II da EBP2 de *P. vivax* e suas frequências em cada região da Amazônia brasileira.

A região analisada foi 67 - 540aa. A primeira letra corresponde ao aminoácido da sequência de referência C127 (Hester et al., 2013; PMID: 24340114), o número é a posição e a segunda letra é o aminoácido substituído. RR: Roraima, RO: Rondônia, PA: Pará, MT: Mato Grosso, AM: Amazonas e AP: Amapá.



5.2.2 Mapeamento de SNPs na estrutura da EBP2

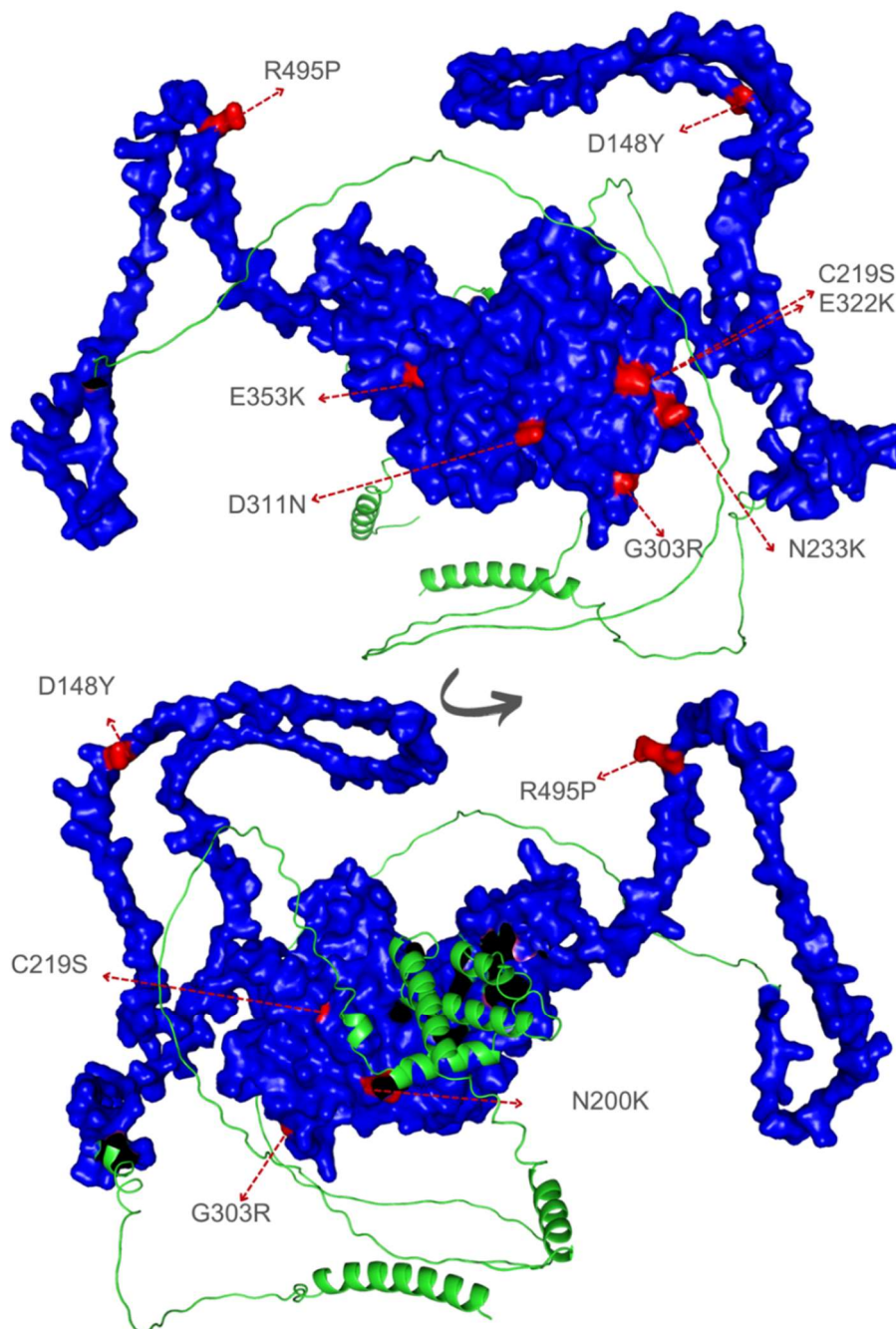
A partir dos mapeamentos das mutações de aminoácidos na estrutura tridimensional da EBP2 (Figura 20) foi possível observar que a maioria das alterações se concentraram em uma região específica do domínio DBL (em vermelho). Além disso, apenas duas substituições aparecem em regiões mais isoladas. Como algumas mutações se localizaram dentro da estrutura da proteína, as mesmas não foram identificadas na figura 3D (Figura 20). Como o sítio de

Resultados

ligação ao receptor da EBP2 ainda não foi definido, não é possível avaliar se o mesmo corresponde a regiões conservadas ou variáveis da proteína.

Figura 20. Mapeamento das substituições de aminoácidos identificadas para a região II da *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) em amostras de *Plasmodium vivax* da Amazônia brasileira.

A região II (domínio DBL) da EBP2 está destacada em azul. Em vermelho são mostradas as substituições de aminoácidos. A primeira letra corresponde ao aminoácido da sequência referência do Camboja C127, o número é a posição e a segunda letra refere à substituição do aminoácido. A estrutura 3D foi modelada no *Swiss Model* e modificada usando o software *PyMOL 2.5.5*.



5.3 Comparação entre a variabilidade genética da EBP2 e DBPII em parasitos circulantes em áreas endêmicas brasileiras

Das 71 amostras sequenciadas para o domínio DBL da EBP2, 43 (61%) foram também sequenciadas para a DBPII, região II da DBP (Figura 21). Algumas das amostras amplificadas para *ebp2*, não amplificaram para *dbpII*. Para amplificar e sequenciar a DBPII, os iniciadores senso (forward) e anti-senso (reverse) se anelam nas posições 944 e 1933, respectivamente, gerando um fragmento de 990pb. Assim, a confirmação da amplificação do domínio DBL da DBPII foi observada por meio de uma eletroforese com gel de agarose (1%) (Figura 22).

Figura 21. Amostras sequenciadas para a região II da *Duffy binding protein* (DBPII) e da *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) de *Plasmodium vivax* por estado da Amazônia Legal.

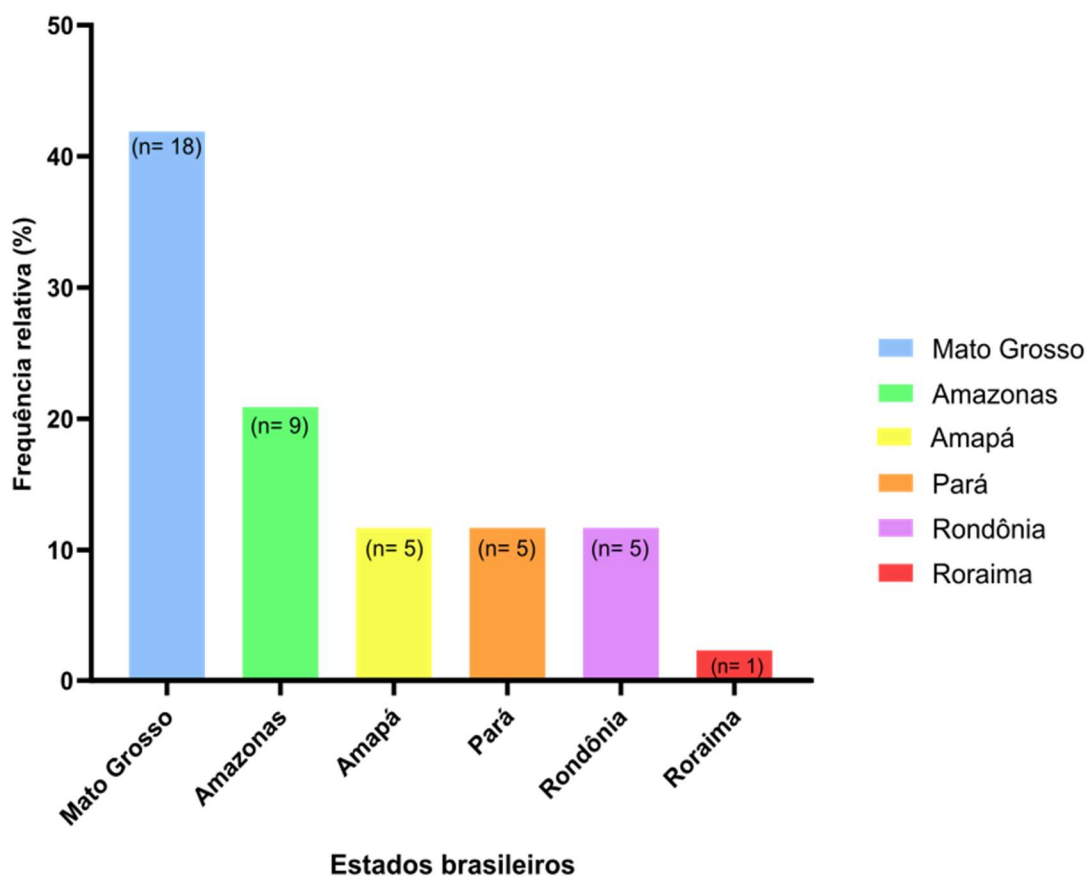
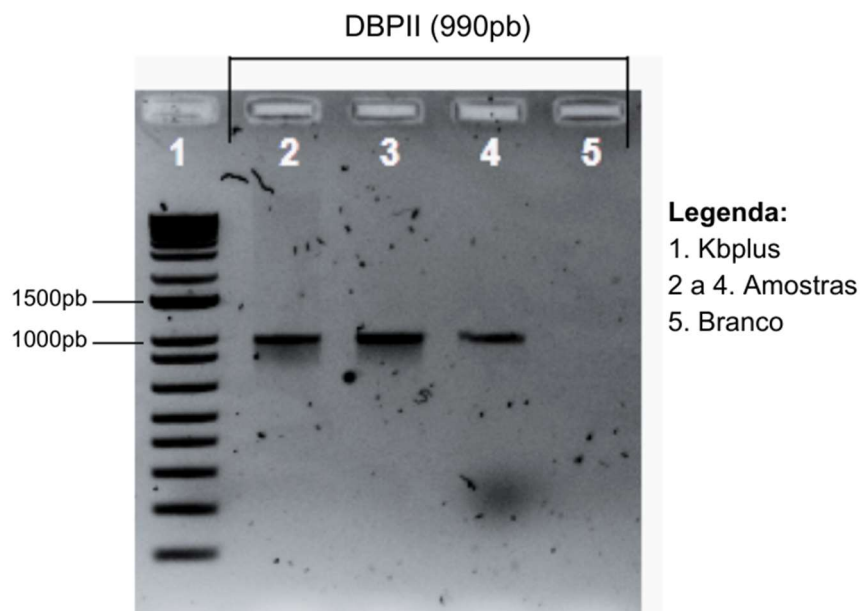


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose ilustrando a banda de 990 pb correspondente ao gene *dbpII* de *Plasmodium vivax*.

A canaleta 1 corresponde ao marcador molecular de 1Kb plus DNA Ladder, as canaletas 2 a 4 correspondem a três amostras amplificadas para PvDBP_{II} (990pb) e a canaleta 5 corresponde ao controle negativo (água).



Para a região de 801pb (262 – 528aa) sequenciada da DBP_{II}, as posições dos aminoácidos foram numeradas de acordo com Fang *et al.*, (1991). Foram identificados 19 polimorfismos de base única (SNP) nas sequências analisadas quando comparadas com a referência Sal-1 (acesso no GenBank: M61095.1). A partir desses SNPs, foram gerados 18 haplótipos para o gene *dbpII* (Figura 23).

Três SNPs corresponderam a substituições sinônimas (sSNP), sendo os outros 16 SNPs substituições não-sinônimas (nsSNP). As substituições R308S, K371E, D384G, E385K, K386N, R390H, N417K, I419M, L424I, W437R e I503K foram identificadas em várias amostras (Figura 24). Por outro lado, K386Q e Q486E foram encontradas em apenas duas amostras e S398F, S398T e T404R foram observadas em apenas uma amostra.

Resultados

Figura 23. Haplótipos representando DBPII e região II de EBP2 de *P. vivax* da Amazônia brasileira.

As sequências C127 (Hester et al., 2013) e Sal-1 (código de acesso M61095.1), sequências de referência para *ebp2* e *dbpII*, respectivamente, correspondem ao haplótipo 1 de cada lado. Cada linha representa a sequência de cada um dos haplótipos (1 a 15), seguida da frequência detectada nas amostras estudadas (n, %). As diferentes cores representam as bases nitrogenadas (adenina [A]; timina [T]; citosina [C] e guanina [G]). O número abaixo de cada coluna representa a posição do polimorfismo de base única (SNP).

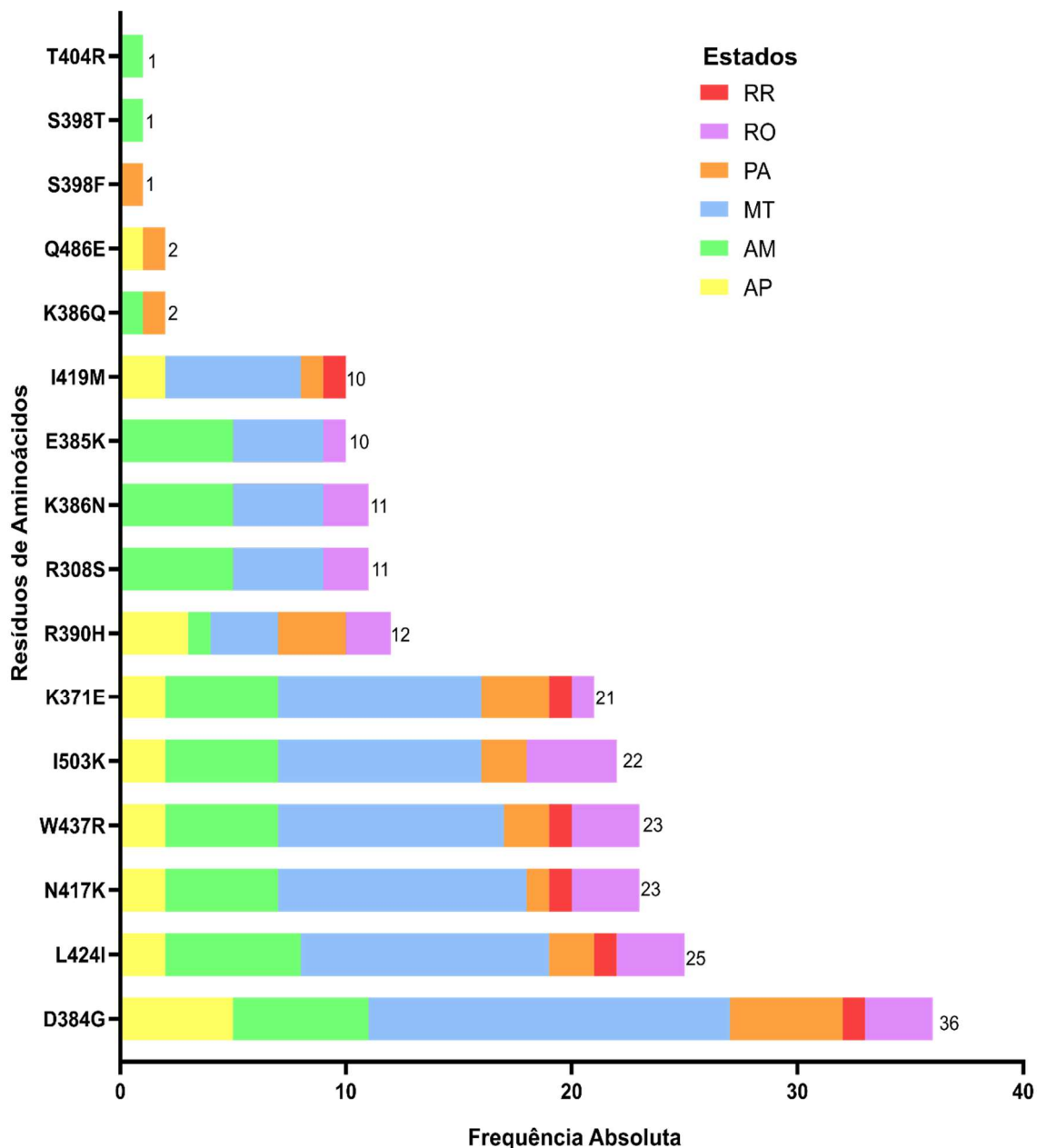
Haplótipos DBPII		Frequência		Haplótipos EBP2		Frequência	
		n	%			n	%
(Sal-1) 1	T G A C A G A G G T C C T A T T C C T	5	11,6	(C127) 1	G T T T G G G G G	11	25,5
2	C G A C G G A G A T C C T A T T C G T	1	2,3	2	G T T T G G G G A	6	13,9
3	T G G C G G A G G T C C A G A C A C T	9	20,9	3	G T T T G G G A G	2	4,6
4	C G A C G G A G A T C C T A T T C C A	1	2,3	4	T T A T G G G G G	5	11,6
5	T G A C G G A G A T C C T A T T C C A	6	13,9	5	G A T T G G G G G	5	11,6
6	T G A C G G A G G T C C T A T T C C T	2	4,7	6	G T T T A G A G G	3	6,9
7	T G A C G G A G G T C C A G A C A C T	1	2,3	7	T A T T G G G G G	2	4,6
8	T T G C G A A T G T C C A A A T C C A	1	2,3	8	T A T T G A G G G	1	2,3
9	T T G C G A A T G T C C A A A C C C A	7	16,2	9	G A T T G A G G G	3	6,9
10	T G A C G G A G G T C C T A T T C C A	1	2,3	10	T T A T G A G G G	1	2,3
11	T G A C A G A G G T C C A A A C C C A	3	6,9	11	G T T A G G A G G	3	6,9
12	T G G C G G A G A T C C T A T T C C T	1	2,3	12	G T A T G G G A G	1	2,3
13	T G G C G G C G G T C C T A T C C C A	1	2,3				
14	T G A C G G A G A T T C T A T T C G T	1	2,3				
15	T T A T G A A T A T C C T A T T C C T	1	2,3				
16	T T G C G G A T G T C C A A A C C C A	1	2,3				
17	T T A T G A A T A A C G T A A T C C T	1	2,3				
18	T G G C G G C G G T C C A A A C C C A	1	2,3				

917 926 1113 1126 1153 1155 1158 1160 1171 1194 1195 1213 1253 1259 1272 1311 1394 1458 1510

442 800 655 689 802 907 931 964 1057

Figura 24. Descrição dos polimorfismos não-sinônimos (nsSNPs) para DBPII de *P. vivax* e suas frequências em cada região da Amazônia brasileira.

A região analisada foi 262 – 528aa e as posições foram numeradas conforme Fang et al., (1991; PMID: 1849231). A primeira letra corresponde ao aminoácido da sequência de referência Sal-1 (acesso: M61095.1), o número é a posição e a segunda letra é o aminoácido mutado. RR: Roraima, RO: Rondônia, PA: Pará, MT: Mato Grosso, AM: Amazonas e AP: Amapá.



Quando se avaliou os 1423pb (198–1620pb) do domínio DBL da EBP2 nas mesmas 43 amostras, a EBP2 se mostrou menos polimórfica, apresentando apenas 9 SNPs, sendo todos substituições não-sinônimas de aminoácidos (nsSNP), que geraram 12 haplótipos (Figura 23).

Resultados

As substituições de aminoácidos e os haplótipos identificados foram descritos no tópico 5.2 deste documento (Figuras 17 e 19). O haplótipo mais frequente foi o da referência (C127). As substituições mais frequentes foram as mesmas descritas anteriormente (N200K - 11 amostras; D148Y - 9 amostras; C219S - 7 amostras; D311N e E353K - 6 amostras; G303R - 5 amostras; N233K, D268N e E322K - 3 amostras).

Ao analisar a diversidade genética, a região II do gene que codifica a DBP_{II} demonstrou ser bem mais variável quando comparado com o da EBP2. Além da quantidade de SNPs e haplótipos apresentados anteriormente, a diversidade de nucleotídeos (π) de *dbpII* foi maior ($\pi = 0,00698$) do que *ebp2* ($\pi = 0,00145$), embora os níveis de diversidade haplotípica foram similares, com $hd = 0,909$ para *dbpII* e $hd = 0,882$ para *ebp2* (Tabela 6).

Tabela 6. Diversidade genética da região II dos genes que codificam as proteínas DBP_{II} e EBP2 de *Plasmodium vivax* em amostras de regiões endêmicas para malária no Brasil.

n°: número de amostras. pb: pares de bases. S: número de sítios polimórficos. nsSNP: substituições não-sinônimas. sSNP: substituições sinônimas. H: haplótipos. π : diversidade de nucleotídeos. Hd: diversidade de haplótipos. SD: Desvio padrão.

Gene	n°	pb	S	nsSNP	sSNP	H	π (SD)	Hd (SD)
<i>dbpII</i>	43	801	19	16	3	18	0,00698 (0,00033)	0,909 (0,023)
<i>ebp2</i>		1423	9	9	0	12	0,00145 (0,00013)	0,882 (0,029)

5.4 Variabilidade genética global da EBP2

5.4.1 Diversidade Genotípica e haplotípica da região II da EBP2

Para obter uma perspectiva global, compilou-se 352 sequências do gene que codifica a região II da *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) disponíveis no GenBank provenientes do Camboja (n = 150), Madagascar (n = 69), Mianmar (n = 10), Papua-Nova Guiné (n = 16), Coreia do Sul (n = 10), Tailândia (n = 72) e Vietnã (n = 25). Assim, o total de sequências alinhadas foram 423, sendo 352 do

Resultados

GenBank, 71 brasileiras (aqui obtidas) e a sequência de referência C127 (KC987954).

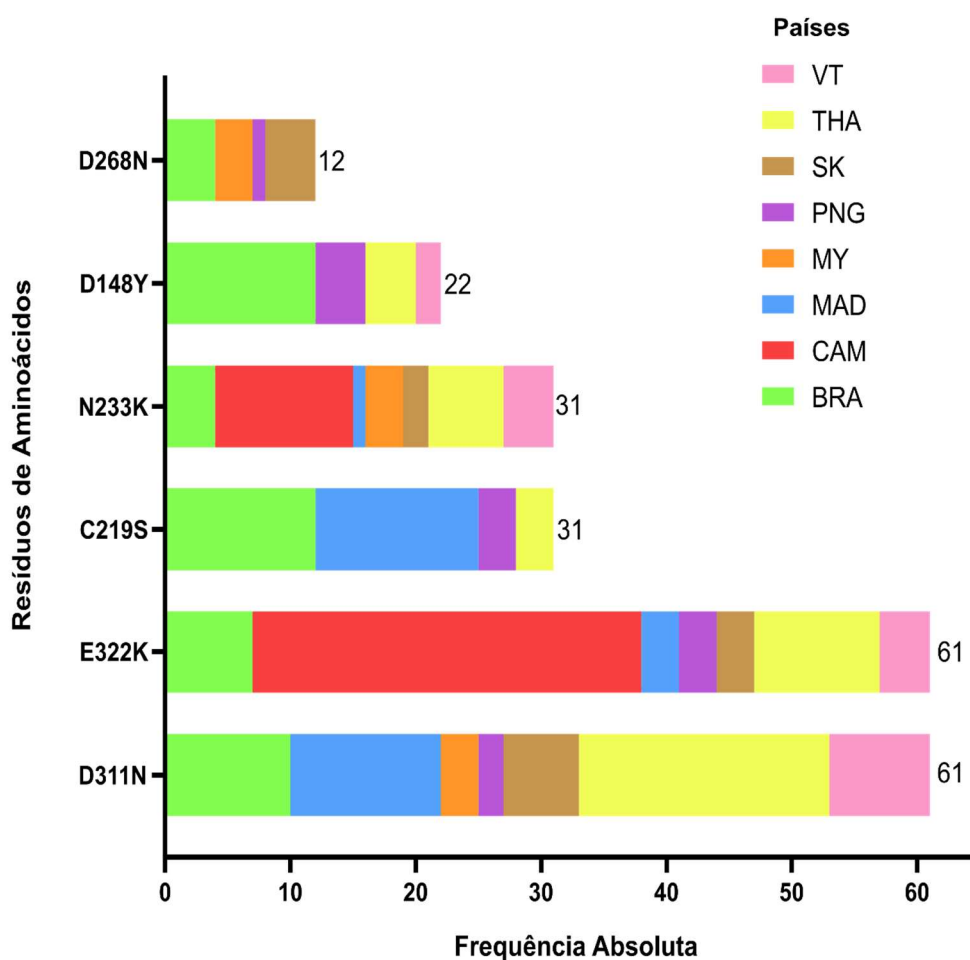
Foram identificados 30 polimorfismos de base única (SNPs) (variando de 6 a 16 por país). As substituições de aminoácidos mais frequente (em 61 sequências) foram D311N e E322K (Figura 25). Estas mesmas substituições foram também as mais amplamente distribuídas, presentes em sete, dos oito países avaliados, incluindo o Brasil. Apesar da substituição N233K ser menos frequente (31 sequências), ela também está presente em 7 países. As substituições D148Y, C219S e D268N, foram identificadas em 50% dos países avaliados e apareceram em frequência variadas (22, 31 e 12 sequencias, respectivamente). A segunda substituição mais frequente foi E306K, em 32 amostras (Tabela Suplementar S1). No entanto, apesar de sua alta frequência, a mesma foi identificada em apenas três países. As demais substituições foram identificadas em 3 ou menos países e as frequências podem ser observadas na Tabela Suplementar S1.

Em análises posteriores, os 30 SNPs encontrados foram usados para identificar os haplótipos que circulam entre os oito países analisados. As análises permitiram identificar um total de 42 haplótipos, variando de 5 (Coreia do Sul) a 20 (Tailândia) por país (Figura 26). A figura 28 ilustra a distribuição haplotípica global da EBP2. A frequência completa dos haplótipos nos oito países pode ser observada na Tabela Suplementar 2.

Resultados

Figura 25. Descrição dos polimorfismos não-sinônimos (nsSNPs) mais distribuídos para a região II da EBP2 de *P. vivax* e suas frequências em cada população geográfica.

A região analisada foi 67aa - 540aa. A primeira letra corresponde ao aminoácido da sequência de referência C127 (Hester et al., 2013; PMID: 24340114), o número é a posição e a segunda letra é o aminoácido substituído. BRA: Brasil, CAM: Camboja, MAD: Madagascar, MY: Myanmar, PNG: Papua Nova Guiné, SK: Coreia do Sul, THA: Tailândia, VT: Vietnã. Os dados brutos estão na Tabela Suplementar S1.



Resultados

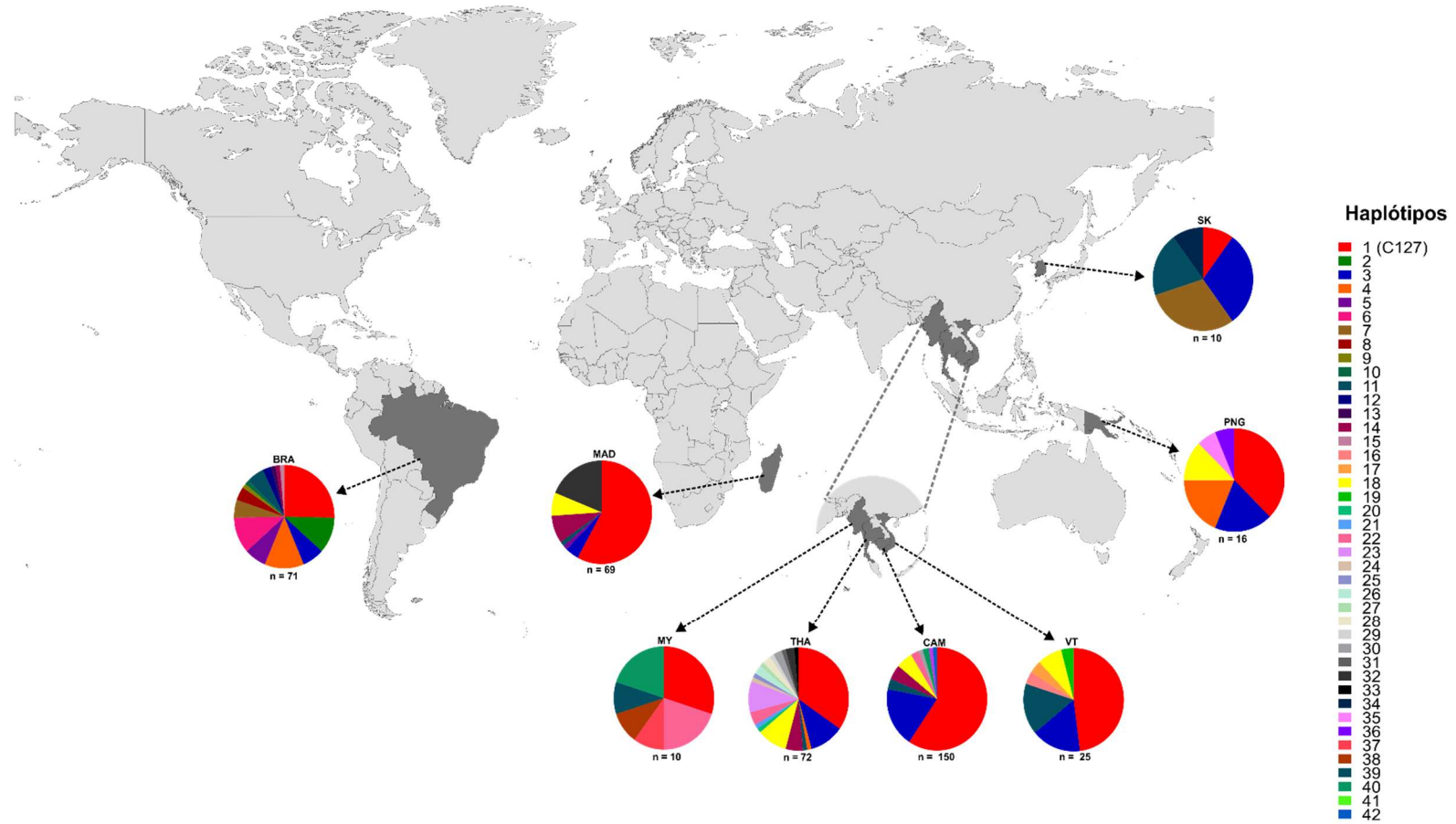
Figura 26. Haplótipos que representam a região II da *Erythrocyte binding protein 2 (EBP2)* de *Plasmodium vivax* em 423 amostras globais.

A sequência referência C127 corresponde ao haplótipo 1. Cada linha representa a sequência de cada um dos haplótipos (1 a 12), seguida da frequência detectada nas amostras estudadas (n, %). As diferentes cores representam as bases nitrogenadas (adenina [A]; timina [T]; citosina [C] e guanina [G]). Os haplótipos comuns para as amostras do Brasil estão destacados em pontilhado. O número abaixo de cada coluna representa a posição do polimorfismo de base única (SNP).

		HAPLÓTIPOS EBP2														Frequência																	
																n	%																
- - - - - Brasil - - - - -	(C127) 1	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	194	46
	2	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	8	1,9
	3	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	54	13	
	4	A	T	C	T	A	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	13	3
	5	A	G	C	A	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	6	1,4
	6	A	G	C	A	T	T	A	G	A	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	8	1,9
	7	A	G	C	T	T	T	A	A	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	7	1,7
	8	A	T	C	A	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	3	0,7
	9	A	T	C	A	T	T	A	G	A	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	10	A	T	C	T	A	T	A	G	A	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	11	A	G	C	T	T	A	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	17	4
	12	A	G	C	T	A	T	A	G	G	G	G	A	A	G	A	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	2	0,5
	13	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	C	G	1	0,2
	14	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	G	G	G	G	G	18	4
	15	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	G	A	G	G	G	G	1	0,2
	16	A	T	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	C	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	17	A	T	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	18	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	24	6
	19	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	G	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2	
	20	A	T	C	T	T	T	T	G	G	G	A	A	G	A	G	G	A	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	21	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	A	G	G	G	1	0,2
	22	A	G	C	T	T	A	A	G	G	A	A	A	G	A	G	G	C	T	T	T	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	9	2
	23	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	G	G	G	G	G	7	1,7
	24	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	A	G	G	1	0,2
	25	A	G	T	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	26	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	G	G	G	G	G	2	0,5
	27	A	G	C	T	T	A	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	28	A	T	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	2	0,5
	29	A	G	C	T	T	A	A	G	G	A	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	G	1	0,2
	30	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	A	G	A	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	G	G	G	G	G	4	0,95
	31	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	32	A	G	C	T	A	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	15	4
	33	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	G	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	34	A	G	C	T	T	T	A	A	G	G	A	A	G	A	G	A	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	35	A	G	C	T	T	T	A	A	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	T	1	0,2
	36	A	T	C	T	T	T	A	G	G	G	G	T	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	G	G	G	G	G	1	0,2
	37	C	G	C	T	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	38	C	G	C	T	T	T	A	A	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	G	G	G	G	G	1	0,2
	39	C	G	C	T	T	T	A	A	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	1	0,2
	40	A	G	C	T	T	T	A	A	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	T	T	A	G	G	G	G	5	1,2
	41	A	G	C	T	T	A	A	G	G	G	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C	G	A	T	T	T	A	G	G	G	G	2	0,5
	42	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C	T	T	C	C	A	T	A	T	A	G	G	G	G	2	0,5

Figura 27. Mapa mostrando a distribuição e frequência por país dos haplótipos EBP2 (região II).

As frequências de 42 haplótipos baseadas nas 30 mutações de aminoácidos não-sinônimas no EBP2 são representadas como gráficos de pizza e mapeadas de acordo com suas origens geográficas. BRA: Brasil, CAM: Camboja, MAD: Madagascar, MY: Myanmar, PNG: Papua Nova Guiné, SK: Coreia do Sul, THA: Tailândia, VT: Vietnã.



Resultados

As métricas genéticas populacionais foram examinadas para avaliar a diversidade de nucleotídeos (π) e de diversidade de haplótipos (hd) para EBP2. A maior diversidade de nucleotídeos foi encontrada na população do Mianmar (0,00181), seguido pela Coreia do Sul (0,00154), Brasil (0,00151), Tailândia (0,00126), Papua-Nova Guiné (0,00119), Vietnã (0,00091), Camboja (0,00074) e a mais conservada, Madagascar (0,00063) (Tabela 7). O nível de diversidade de haplótipos (hd) foi igualmente alto e bastante semelhante, variando de 0,607 a 0,883 para o Camboja e Brasil, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Estimativas de diversidade genética para o domínio DBL da Erythrocyte binding protein 2 (EBP2) de *Plasmodium vivax* em isolados de áreas endêmicas de malária.

Nº: número de amostras. S: número de sítios polimórficos. H: Haplótipos. π : diversidade de nucleotídeos. Hd: diversidade de haplótipos.

Continentes	País	Nº	S	H	π (SD)	Hd (SD)
América do Sul	Brasil	71	12	15	0,00151 (0,00010)	0,883 (0,021)
Sudeste Asiático	Camboja	150	9	10	0,00074 (0,00008)	0,607 (0,040)
África	Madagascar	69	6	7	0,00063 (0,00008)	0,617 (0,056)
Sudeste Asiático	Mianmar	10	7	6	0,00181 (0,00039)	0,855 (0,085)
Oceania	Papua-Nova Guiné	16	8	6	0,00119 (0,00024)	0,794 (0,075)
Leste da Ásia	Coreia do Sul	10	5	5	0,00154 (0,00017)	0,873 (0,071)
Sudeste Asiático	Tailândia	72	16	20	0,00126 (0,00014)	0,845 (0,034)
Sudeste Asiático	Vietnã	25	6	7	0,00091 (0,00016)	0,720 (0,079)
Global		423	30	42	0,00113 (0,00006)	0,763 (0,020)

5.4.2 Diferenciação genética da EBP2 entre as diferentes regiões geográficas

A diferenciação genética entre as populações de parasitos também foi avaliada pelo índice de fixação (F_{ST}) para determinar como a diversidade foi distribuída entre as regiões geográficas (Figura 28). A maior diferenciação foi identificada entre Madagascar e a Coreia do Sul com 0,204 (alta diferenciação genética) e a menor foi entre o Camboja e o Vietnã com 0,013 (pouca diferenciação). A Coreia do Sul apresentou alta diferenciação genética com todos os países, exceto com Mianmar. Os parasitos do Brasil apresentaram baixa diferenciação genética com a Papua-Nova Guiné (0,023), diferenciação moderada com Mianmar, Tailândia, Vietnã, Camboja e Madagascar (entre 0,15 e 0,25) e alta diferenciação com parasitos da Coreia do Sul (0,172).

Figura 28. Estimativas de diversidade genética e diferenciação global para o EBP2 nas populações de *P. vivax*.

Os números nas células são o índice de fixação (F_{ST}) e os mapas térmicos mostram a comparação entre duas áreas endêmicas de malária. Quanto mais vermelho for, maior será a diferenciação genética. BRA: Brasil, CAM: Camboja, MAD: Madagascar, MY: Mianmar, PNG: Papua-Nova Guiné, SK: Coreia do Sul, THA: Tailândia, VT: Vietnã.

	BRA	MAD	CAM	MY	PNG	SK	THA
VT	0,077	0,063	0,013	0,072	0,040	0,079	0,016
THA	0,079	0,038	0,020	0,063	0,034	0,114	
SK	0,171	0,204	0,141	0,056	0,153		
PNG	0,023	0,026	0,039	0,114			
MY	0,120	0,119	0,092				
CAM	0,089	0,054					
MAD	0,071						

5.4.3 Testes de neutralidade

O teste D de Tajima (Tajima, 1989) foi utilizado para avaliar o modelo neutro de evolução molecular (Kimura 1983) e a hipótese nula foi rejeitada. Quase todos os países apresentaram valores negativos para esse teste, exceto Mianmar (0,325) e a Coreia do Sul (0,257) que apresentaram valores positivos, mas estatisticamente não significativos (Tabela 8). Os valores negativos indicam um excesso de polimorfismos em baixa frequência (raros) em comparação com o que seria esperado sob um modelo neutro de evolução.

Ao realizar os testes estatísticos D* e F*, propostos por Fu & Li (1993), a fim de testar hipóteses previstas pela teoria neutra de evolução molecular, identificou-se valores negativos para todas as regiões, exceto para o Camboja, Mianmar e Coreia do Sul, indicando um excesso de haplótipos raros em relação ao que seria esperado sob neutralidade (Tabela 8).

Tabela 8. Índices de neutralidade para o gene que codifica a região II da *Erythrocyte binding protein 2* (EBP2) de *Plasmodium vivax* amostrados em diferentes países endêmicos para malária.

Nº = número de amostras. Tajima'D = estatística de Tajima (Tajima, 1989); F* e D* de Fu e Li's = estatística de Fu e Li's (1993). Todos os valores são não significativos, P > 0,10.

Países	Nº	Tajima's D	Fu e Li's	
			D	F
Brasil	71	-0,370	-0,287	-0,375
Camboja	150	-0,816	1,291	0,649
Madagascar	69	-0,672	-0,669	-0,789
Mianmar	10	0,325	0,845	0,806
Papua-Nova Guiné	16	-1,009	-0,798	-0,986
Coreia do Sul	10	0,257	0,149	0,198
Tailândia	72	-1,328	-1,287	-1,548
Vietnã	25	-0,538	-0,273	-0,407

6. DISCUSSÃO

Até o momento, existem poucos trabalhos que caracterizaram a variabilidade genética da *Erythrocyte Binding Protein 2 (EBP2)*. A partir da identificação dessa proteína, em 2013 por Hester e colaboradores, foi visto que a mesma compartilha domínios-chave com a família de proteínas EBL/DBL, como o domínio DBL (região II) da DBPII, responsável pelo processo de invasão das células hospedeiras. Além disso, a EBP2 é expressa no estágio sanguíneo do ciclo de vida do parasito, período em que ocorre a invasão dos reticulócitos. Em um trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa, verificou-se que a EBP2 se liga, preferencialmente, a reticulócitos imaturos com alta expressão de CD71 e em reticulócitos *Duffy* positivos, com menor ligação aos *Duffy* negativos (Ntumngia *et al.*, 2016). Como o CD71 é mais expresso em reticulócitos presentes na medula óssea, isto é, reticulócitos muito jovens (PARMLEY; HAJDU; DENYS, 1983), esses resultados sugerem que essa proteína pode estar envolvida em uma via de invasão alternativa e ainda desconhecida. Estudos que visam validar o potencial da EBP2 como antígeno candidato a vacina são importantes. o presente estudo foi pioneiro na identificação dos polimorfismos de base única (SNPs) e caracterização da diversidade genética da EBP2 em isolados de *P. vivax* da região Amazônica brasileira.

6.1 Prevalência da EBP2 em parasitos circulantes em áreas endêmicas brasileiras

Durante a remontagem do genoma de *P. vivax* e a identificação da EBP2, no isolado clínico do Camboja (C127), observou-se que a cepa de referência da PvDBPII, Salvador-1 (Sal-1), tinha deleção no gene *ebp2* (Hester *et al.*, 2013). Baseado nestes achados preliminares, a hipótese inicial do trabalho aqui apresentado era a de que a deleção no gene da *ebp2* poderia ser frequente em isolados da Amazônia brasileira. No entanto, de forma interessante e inédita, verificou-se que o gene da *ebp2* estava presente em 100% das amostras estudadas, que incluía isolados de *P. vivax* de diferentes estados da Amazônia brasileira (Amazonas, Amapá, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima). Isto sugere alta prevalência da EBP2 na Amazônia brasileira. É importante ressaltar

que esse resultado só foi possível com a utilização de técnicas de amplificação Semi-nested PCR e Nested PCR, que são mais sensíveis quando comparadas com o PCR convencional. Concordando com estes achados, a Nested PCR também foi utilizada em um dos poucos estudos que avaliou a variabilidade genética da EBP2 (Roesh et al., 2018). Tendo em vista a relevância de proteínas com o domínio DBL, como a EBP2, para compor uma vacina multi-antígeno contra as formas sanguíneas de *P. vivax*, os achados aqui encontrados são interessantes, pois confirmam a alta prevalência desta proteína em áreas endêmicas. Assim, estudos futuros fazem-se necessário para definir o papel da DBP2 como um ligante que participa ativamente na invasão dos reticulócitos pelo *P. vivax*.

6.2 Comparação entre a variabilidade genética da DBP2 e EP2 (região

II)

Atualmente, não existem vacinas aprovadas para uso contra *P. vivax*. Dentre as vacinas que se encontram em fase de ensaio clínico, a maioria se baseia na DBP2, já que o bloqueio da interação DBP2-DARC previne a invasão dos reticulócitos para a maior parte das variantes de *P. vivax* circulando nas áreas endêmicas. Entre as vacinas baseadas na DBP2, com resultados de ensaios clínicos conferindo um certo grau de proteção, incluem-se a ChAd63-MVA-PvDBP2 (Payne et al., 2017), PvDBP2-GLA-SE (Singh et al., 2018) e PvDBP2/Matrix-M (Hou et al., 2022). No entanto, o desenvolvimento de uma vacina contra a malária baseada somente em DBP2 tem sido dificultado por essa proteína: i) ser pouco imunogênica (Cole-Tobian et al., 2009); ii) possuir alto grau de polimorfismo, que parece crítico para a evasão da resposta imune do hospedeiro (Tsuboi et al., 1994; VanBuskirk et al. 2004; Sousa et al., 2011) e iii) induzir anticorpos alelo-específicos (Ceravolo et al., 2009). Assim, buscou-se aqui analisar, comparativamente, a variabilidade genética da EBP2 e da DBP2 nos mesmos isolados de *P. vivax* da Amazônia brasileira. O principal achado confirmou a EBP2 como menos polimórfica do que a DBP2. Para *dbp2* foi observada uma diversidade de nucleotídeos (π) de 0,00698 e haplotípica (hd) de 0,909. Por outro lado, para *ebp2* a diversidade nucleotídica foi de 0,00152 e haplotípica de 0,893, para as mesmas amostras.

Os achados aqui apresentados de que PvDBP2 em amostras da Amazônia brasileira é altamente polimórfica e apresenta múltiplos alelos corroboram com

outros trabalhos que avaliaram esse antígeno e verificaram uma alta diversidade genética em isolados de diferentes regiões do mundo (Ampudia *et al.*, 1996; Xainli, Adams, King, 2000; Kho *et al.*, 2001; Gosi *et al.*, 2008; Babaeekho L, Zakeri S, Djadid ND, 2009; Premaratne *et al.*, 2011; Ju *et al.*, 2013; Ntumngia *et al.*, 2013; Valizadeh *et al.*, 2014; Chootong *et al.*, 2014; Wongkidakarn *et al.*, 2016; Roesh *et al.*, 2018). Em amostras da Amazônia brasileira, nosso grupo de pesquisa identificou para o gene para *dbpII* um total de 19 SNPs organizados em 34 haplótipos (Sousa *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2010). Baseado em dados de variabilidade global do gene da *dbpII*, o nosso grupo de pesquisa sugeriu que apenas uma vacina utilizando um número significativo de variantes da PvDBP_{II} poderia ser promissora (Sousa *et al.*, 2011).

Nas amostras aqui estudadas, alguns dos polimorfismos identificados para *dbpII* foram caracterizados anteriormente por VanBuskirk e colaboradores (2004a) como sendo capazes de alterar o reconhecimento imune da proteína; principalmente os resíduos W437R e I503, que são capazes de inibir a ligação dos eritrócitos a DBP_{II} *in vitro*. Além disso, a associação entre os resíduos N417K, L424I e W437R (também identificados nas amostras aqui sequenciadas) sugere que esses aminoácidos constituam um epítopo alvo de anticorpos inibitórios (VanBuskirk 2004). Por outro lado, uma forte associação foi observada entre os resíduos nas posições N417K, W437R e I503K (VanBuskirk *et al.*, 2004a). Em conjunto, esses resultados sugerem que a variação na pressão seletiva exercida no gene da *dbpII* pelo sistema imune hospedeiro possa refletir em diferenças no padrão de SNPs entre os isolados de *P. vivax* de diferentes regiões do mundo.

O presente estudo é pioneiro na caracterização da EBP2 em isolados de *P. vivax* da região da Amazônia brasileira bem como na região das Américas. Até o momento, apenas quatro estudos avaliaram a EBP2 do ponto de vista molecular (Hester *et al.*, 2013; Roesh *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2022) e a baixa diversidade genética aqui identificada para esse gene, também foi observada nestes estudos anteriores. Na descrição original do gene da *ebp2*, realizado por Hester e colaboradores (2013), a região II da EBP2 foi menos polimórfica do que a DBP_{II} nas mesmas amostras, com 11 sítios polimórficos (2 SNPs sinônimos e 9 não-sinônimos) e 32 sítios polimórficos (4 SNPs sinônimos e 28 não sinônimos), respectivamente. No estudo de Roesh e colaboradores (2018), onde os autores

avaliaram comparativamente a EBP2 e a DBP II em amostras do Camboja e de Madagascar, também se observou-se maior variabilidade genética para *dbpII*. Naquele estudo, os autores identificaram 23 sítios polimórficos para *dbpII* e apenas 11 para a região II da *ebp2*, com a maioria das amostras (59%) idênticas à referência (C127). Em um trabalho recente, conduzido pelo nosso grupo em área de surto autóctone de *P. vivax* (região metropolitana de Belo Horizonte), foi possível observar um único SNP (G1057A) do gene da *ebp2*, que resultou uma mutação não sinônima (E353K) (Lima *et al.*, 2022). Este resultado reforça os achados aqui apresentados que essa proteína não é muito variável no Brasil. De fato, de todos os estudos sobre a variabilidade genética da EBP2 publicados até o momento, apenas nos estudos de Han e colaboradores (2020) foi descrito elevado grau de polimorfismo do gene da *ebp2* (45 substituições não sinônimas), sendo as amostras provenientes de países asiáticos e da Oceania, incluindo Coreia do Sul, Tailândia, Mianmar, Vietnã e Papua-Nova Guiné.

Em relação à resposta imune contra a EBP2, um estudo preliminar do nosso grupo mostrou que entre 35% e 90% dos indivíduos residentes de área endêmica para malária na Amazônia apresentavam anticorpos IgG contra a EBP2, sendo a prevalência função do tempo de exposição à transmissão (Torres, 2017). Estes dados foram confirmados posteriormente por He e colaboradores (2019), que demonstraram que os níveis de anti-EBP2 foram positivamente correlacionados com a idade e exposição cumulativa. De relevância estes autores demonstraram que a positividade simultânea de anticorpos EBP2/DBP II foi associada a um risco reduzido de doença clínica. Em outro trabalho conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, a alta frequência de anticorpos IgG para EBP2 foi encontrada em primatas neotropicais, onde o aumento da soropositividade foi função da maior exposição a dos animais à picada de mosquitos vetores (Assis *et al.*, 2021). Estes dados são de interesse, já que estes primatas não humanos são, em geral, assintomáticos ou oligossintomáticos para malária.

No estudo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, que identificou apenas um SNP para *ebp2* em uma amostra de primo-infecção pelo *P. vivax* (surto autóctone), foi observado uma baixa imunogenicidade da EBP2 (Lima *et al.*, 2022). No entanto, a presença deste único polimorfismo não parece justificar a baixa imunogenicidade encontrada, já que o alelo *ebp2* do surto de *P. vivax* apresentou

alta identidade com o isolado de referência C127 utilizado nesse estudo como proteína recombinante para detecção de anticorpos. Por outro lado, é possível se especular que a baixa imunogenicidade a EBP2 nos indivíduos primoinfectados pode estar relacionada à necessidade de inúmeras exposições ao parasito. De fato, os estudos conduzidos na Amazônia pelo nosso grupo reforçam o papel da exposição prolongada ao *P. vivax* para se detectar elevada frequência de resposta de anticorpos contra a EBP2 (Torres, 2017; Lima, 2022). Estudos futuros se fazem necessários para avaliar a capacidade dos anticorpos IgG contra EBP2 bloquear a invasão de reticulócitos por *P. vivax*.

Uma das limitações do nosso estudo foi a impossibilidade de comparação da variabilidade genética da EBP2 e da DBP-II entre os diferentes estados brasileiros, devido ao número de amostras e o período de coleta variar entre os estados.

6.3 Variabilidade genética global da EBP2 (região II)

Os resultados aqui apresentados permitiram confirmar que a baixa variabilidade genética de *ebp2*, *identificada* nas amostras da Amazônia brasileira se manteve em outras regiões do mundo, isto é, nas 423 sequências disponíveis no GenBank. Os SNPs variaram de 6 a 16 por país e os haplótipos variaram de 5 a 20. Além disso, a diversidade de nucleotídeos (π) do gene *ebp2* variou entre 0,00063 e 0,00181 e foi bem menor do que π para *dbpII* (0,00698). Esses achados demonstram que o gene *ebp2* se mantém pouco variável, quando comparado à *dbpII*, em diversas regiões do mundo.

Quando se avaliou as substituições de aminoácidos mais frequentes no mundo (D311N, E322K, E306K, C219S, N233K, D148Y e N200K), a maioria está presente também no Brasil. Além disso, as substituições mais amplamente distribuídas (D148Y, C219S, N233K, D268N, D311N e E322K), ou seja, presentes em pelo menos 50% dos países avaliados, também foram comuns no Brasil. Estes achados são relevantes, já que a identificação dos polimorfismos prevalentes globalmente pode auxiliar no desenvolvimento de construções vacinais que poderão ser imunogênicas em diferentes regiões de transmissão. Estes achados se aplicam também para os haplótipos mais frequentes e com ampla distribuição geográfica.

Nos oito países avaliados, o haplótipo correspondente ao isolado da *ebp2* de referência (C127) foi o mais prevalente, variando de 10% a 59% nos países estudados. O segundo haplótipo mais frequente no mundo, haplótipo 3, também está presente no Brasil. Em conjunto, os achados são interessantes, pois entender a dinâmica de distribuição e circulação dos haplótipos de *ebp2*, no Brasil e no mundo, poderá contribuir na definição dos melhores alvos para a condução de estudos futuros visando caracterizar imunologicamente a EBP2.

O índice de diferenciação genética (F_{ST}) de Wright (1978) revelou um fluxo gênico intenso entre as populações do Vietnã, Camboja, Papua-Nova Guiné e Tailândia, que apresentaram uma baixa diferenciação genética. E um certo grau de isolamento entre Madagascar e a Coreia do Sul, que apresentaram a maior diferenciação genética. Esse resultado pode ser explicado pelo princípio de isolamento por distância, em que as populações de parasitos são geneticamente semelhantes em regiões geográficas próximas. Por outro lado, o Brasil possui uma alta diferenciação com a Coreia do Sul (0,172), diferenciação moderada com Mianmar, Tailândia, Vietnã, Camboja e Madagascar, sugerindo algum grau de isolamento. No entanto, de forma surpreendente as amostras do Brasil apresentam baixa diferenciação genética em relação à PNG ($F_{ST} = 0,023$), país da Oceania, próximo ao Sudeste asiático. As razões para esta semelhança entre Brasil e PNG não são conhecidas. Mais estudos, com um número maior de amostras, se fazem necessários para confirmar estes dados.

Os valores negativos para os testes de neutralidade F e D de Fu e Li's (1993) e D de Tajima (1989), indicam um excesso de polimorfismos e de haplótipos raros em comparação com o que seria esperado sob um modelo neutro de evolução. Este resultado sugere uma expansão populacional após um efeito gargalo ou de uma varredura seletiva. Por outro lado, valores positivos indicam excesso de polimorfismos e haplótipos em frequência intermediária, em comparação com o que seria esperado sob um modelo neutro de evolução. Esse resultado pode ser explicado por uma diminuição no tamanho populacional ou por seleção balanceadora.

Após aplicar os testes de F e D de Fu e Li's (1993) e D de Tajima (1989), a hipótese de evolução neutra foi rejeitada, apesar de não apresentar valores significativos. Quase todas as populações apresentaram valores negativos para os

testes, exceto Mianmar e Coreia do Sul e Camboja, indicando um excesso de polimorfismos e de haplótipos raros em comparação com o que seria esperado sob um modelo neutro de evolução. Contudo, esses valores não foram estatisticamente significativos, possivelmente, pelas limitações no tamanho amostral. De fato, uma das limitações dos testes de neutralidade F e D de Fu e Li's (1993) e D de Tajima (1989) é o tamanho populacional amostrado, pois populações muito pequenas podem não demonstrar o que naturalmente ocorre na população.

Vários estudos têm demonstrado a influência da seleção natural positiva no padrão de diversidade genética dos antígenos do plasmódio, como DBP, AMA-1, MSP-1, MSP-2 e EBA-175 (Ferreira & Hartl, 2007; Ferreira et al., 2007b; Gunasekera et al., 2007; Putaporntip et al., 2006; Verra et al., 2006). A diversidade observada em genes codificadores de antígenos, principalmente do merozoíto e esporozoíto, é comumente atribuída à pressão seletiva imposta pelo sistema imune do hospedeiro. Carlton e colaboradores (2008) ao analisarem 3322 genes de *P. vivax* observaram uma taxa de evolução elevada em genes que codificam proteínas de adesão celular, proteínas exportadas ou ancoradas por cauda de glicosilfosfatidilinositol (GPI), e proteínas com uma região transmembrana ou peptídeo sinal. Esses estudos sugerem uma forte influência da pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro no padrão observado de polimorfismo gênico. Diferentes estudos sugerem que os polimorfismos frequentemente observados na DBP-II de *P. vivax* podem alterar o seu caráter antigênico e interferir no bloqueio da ligação DBP-II-DARC por anticorpos inibitórios (Tsuboi et al., 1994; Xainli et al., 2003; Cole-Tobian & King, 2003; VanBuskirk et al., 2004a). No trabalho de Vanbuskirk e colaboradores (2004a), a substituição por mutagênese sítio-dirigida de alguns resíduos da DBP-II, foi suficiente para alterar significativamente a capacidade do soro de coelhos imunizados com a DBP-II de bloquear a ligação de eritrócitos *in vitro*. Os polimorfismos encontrados em *dbpII* foram capazes de alterar a imunogenicidade da proteína cuja resposta é predominantemente do tipo variante-específica (Ceravolo et al., 2008; King et al., 2008).

Embora os estudos sobre a variabilidade da DBP-II e sua influência na resposta imune tem sido bem estudados, pouco se sabe ainda sobre a relevância imunológica da variabilidade da EBP2. Assim, estudos futuros fazem-se necessário

para avaliar a relação entre diversidade da EBP2 e imunidade natural. o que permitirá avaliar o potencial desta proteína como candidato vacinal contra *P. vivax*.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, onde a variabilidade genética da EBP2 foi estudada pela primeira vez em um país da América Latina, foi possível concluir que:

1. O Brasil possui alta prevalência da EBP2 em isolados da Amazônia brasileira;
2. A variabilidade genética da EBP2 é menor do que a da DBPII em isolados de *P. vivax* da Amazônia brasileira;
3. O gene *ebp2* é pouco variável em diversas regiões do mundo, se comparado ao gene *dbpII*;
4. As substituições de aminoácidos da EBP2 com maior frequência e distribuição em países da Ásia, Oceania ou África também são prevalentes no Brasil;
5. O haplótipo da EBP2 predominante no Brasil e no mundo corresponde ao isolado de referência da EBP2, originalmente descrito no Camboja (C127);
6. A hipótese de evolução neutra foi rejeitada para o gene da PvEBP2;
7. Baseado no baixo polimorfismo global do domínio DBL da EBP2, esta proteína tem o potencial para compor uma vacina contra as formas sanguíneas de *P. vivax*.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS JH, MUELLER I. The Biology of *Plasmodium vivax*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 2017 Sep 1;7(9):a025585. doi: 10.1101/cshperspect.a025585. PMID: 28490540; PMCID: PMC5580510.
- ADAMS JH, SIM BK, DOLAN SA, FANG X, KASLOW DC, MILLER LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1992 Aug 1;89(15):7085-9. doi: 10.1073/pnas.89.15.7085. PMID: 1496004; PMCID: PMC49650.
- ALAGANAN, A.; SINGH, P.; CHITNIS, C. E. Molecular mechanisms that mediate invasion and egress of malaria parasites from red blood cells. **Current opinion in hematology**. 2017 May;24(3):208-214. doi: 10.1097/MOH.0000000000000334. PMID: 28306665.
- ALEXANDER, D.L., MITAL, J., WARD, G.E., BRADLEY, P., and BOOTHROYD, J.C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**. 2005 Oct;1(2):e17. doi: 10.1371/journal.ppat.0010017. Epub 2005 Oct 21. PMID: 16244709; PMCID: PMC1262624.
- AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, CELLI S, SHORTE S, FRISCHKNECHT F, MENARD R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**. 2006 Feb;12(2):220-4. doi: 10.1038/nm1350. Epub 2006 Jan 22. PMID: 16429144.
- AMPUDIA E, PATARROYO MA, PATARROYO ME. e MURILLO LA. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 1996. 78, 269- 272
- ARTAVANIS-TSAKONAS K, TONGREN JE, RILEY EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clinical and experimental immunology**. 2003 Aug;133(2):145-52. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02174.x. PMID: 12869017; PMCID: PMC1808775.

-
- ASHLEY EA, PYAE PHYO A, WOODROW CJ. Malaria. **Lancet**. 2018 Apr 21;391(10130):1608-1621. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30324-6. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29631781.
 - ASSIS, GMP et al. Profiling Humoral Immune Response Against Pre-Erythrocytic and Erythrocytic Antigens of Malaria Parasites Among Neotropical Primates in the Brazilian Atlantic Forest. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1 15, 2021.
 - BABAEKHOUS L, ZAKERI S, DJADID ND. Genetic mapping of the duffy binding protein (DBP) ligand domain of *Plasmodium vivax* from unstable malaria region in the Middle East. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2009 Jan;80(1):112-8. Erratum in: Am J Trop Med Hyg. 2020 Oct;103(4):1750. PMID: 19141848.
 - BARBER BE, WILLIAM T, GRIGG MJ, PARAMESWARAN U, PIERA KA, PRICE RN, YEO TW, ANSTEY NM. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction, and disease severity in *vivax* malaria. **PLoS Pathogens**. 2015 Jan 8;11(1):e1004558. doi: 10.1371/journal.ppat.1004558. PMID: 25569250; PMCID: PMC4287532.
 - BARILLAS-MURY C, KUMAR S. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. **Cellular Microbiology**. 2005 Nov;7(11):1539-45. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00615.x. PMID: 16207241.
 - BATON LA, RANFORD-CARTWRIGHT LC. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. **Parasitology**. 2004 Dec;129 (Pt 6):663-76. doi: 10.1017/s0031182004005979. PMID: 15648689.
 - BEESON JG, OSIER FH, ENGWERDA CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. **Trends in Parasitology**. 2008 Dec;24(12):578-84. doi: 10.1016/j.pt.2008.08.008. Epub 2008 Oct 8. PMID: 18848497.
 - BOUSEMA T, DRAKELEY C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**. 2011 Apr;24(2):377-410. doi: 10.1128/CMR.00051-10. PMID: 21482730; PMCID: PMC3122489.

-
- BRASIL P, ZALIS MG, DE PINA-COSTA A, SIQUEIRA AM, JUNIOR CB, SILVA S, AREAS ALL, PELAJO-MACHAO M, DE ALVARENGA DAM, SILVA ACF, ALBUQUERQUE HG, CRAVO P, SANTOS FVA, PETERKA CL, ZANINI GM, SUAREZ MCM, PISSINATTI A, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, BRITTO CFA, FERREIRA-DA-CRUZ MF, CULLETON R, DANIEL-ROBEIRO CT. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**. 2017 Oct;5(10): e1038-e1046. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28867401.
 - CASTRO-GOMES T, MOURÃO LC, MELO GC, MONTEIRO WM, LACERDA MV, BRAGA ÉM. Potential immune mechanisms associated with anemia in *Plasmodium vivax* malaria: a puzzling question. **Infection and immunity**. 2014 Oct;82(10):3990-4000. doi: 10.1128/IAI.01972-14. Epub 2014 Aug 4. Erratum in: **Infection and Immunity**. 2014 Dec;82(12):5346. PMID: 25092911; PMCID: PMC4187874.
 - CAVASINI CE, MATTOS LC, COUTO AA, BONINI-DOMINGOS R, VALENCIA SH, NEIRAS WC, ALVES RT, ROSSIT AR, CASTILHO L, MACHADO RL. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2007 Oct;101(10):1042-4. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.04.011. Epub 2007 Jun 29. PMID: 17604067.
 - CERAVOLO IP, SANCHEZ BA, SOUSA TN, GUERRA BM, SOARES IS, BRAGA EM, MC HENRRY AM, ADAMS JH, BRITO CF, CARVALHO LH. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **British Society for Immunology**. 2009 Jun;156(3):502-10. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03931. x. PMID: 19438604; PMCID: PMC2691980.
 - CERAVOLO IP, SOUZA-SILVA FA, FONTES CJ, BRAGA EM, Madureira AP, Krettli AU, Souza JM, Brito CF, Adams JH, Carvalho LH. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. **Scandinavian journal**

- of immunology.** 2008 Mar;67(3):270-8. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02059.x. Epub 2008 Jan 22. PMID: 18226014.
- CHEN N, AULIFF A, RIECKMANN K, GATTON M, CHENG Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. **The Journal of infectious diseases.** 2007 Apr 1;195(7):934-41. doi: 10.1086/512242. Epub 2007 Feb 26. PMID: 17330782.
 - CHITNIS CE, MILLER LH. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. **The Journal of experimental medicine.** 1994 Aug 1;180(2):497-506. doi: 10.1084/jem.180.2.497. PMID: 8046329; PMCID: PMC2191600.
 - CHOOTONG P, MCHENRY AM, NTUMNGIA FB, SATTABONGKOT J, ADAMS JH. The association of Duffy binding protein region II polymorphisms and its antigenicity in *Plasmodium vivax* isolates from Thailand. **Parasitology international.** 2014. 63, 858–864. 10.1016/j.parint.2014.07.014
 - CHOOTONG P. et al. Characterization of inhibitory anti-duffy binding protein II immunity: Approach to *plasmodium vivax* vaccine development in Thailand. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1 7, 2012.
 - COATNEY GR, COLLINS WE, WARREN McW, CONTACOS PG. The primate malarias. 1st edn. Bethesda, MD: **US National Institute of Allergy and Infectious Diseases**; 1971. Digital Version 1.0. Atlanta, GA: CDC; 2003.
 - COATNEYGR. Relapse in malaria--an enigma. **The Journal of parasitology.** 1976 Feb;62(1):3-9. PMID: 815536.
 - COLE-TOBIAN, J. and KING, C. L. (2003). Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 127, 121-132
 - COLE-TOBIAN, J. L., CORTES, A., BAISOR, M., KASTENS, W., JIA, X. L., BOCKARIE, M., ADAMS, J. H. and KING, C. L. (2002). Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the Duffy binding protein. **Journal of Infectious Diseases**, 186, 531-539.

-
- COLLINS WE, JEFFERY GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. **Clinical Microbiology Reviews**. 2007 Oct;20(4):579-92. doi: 10.1128/CMR.00027-07. PMID: 17934075; PMCID: PMC2176047.
 - COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M.; ROBERTS, J. M. A retrospective examination of the effect of fever and microgametocyte count on mosquito infection on humans infected with *Plasmodium vivax*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. 2004 Jun;70(6):638-41. PMID: 15211005.
 - COMMONS R.J., SIMPSON J.A., WATSON J., WHITE N.J., PRICE R.N. Estimating the Proportion of *Plasmodium vivax* Recurrences Caused by Relapse: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. 2020 Sep;103(3):1094-1099. doi: 10.4269/ajtmh.20-0186. PMID: 32524950; PMCID: PMC7470578.
 - COSTA DC, DA CUNHA VP, DE ASSIS GM, JUNIOR JCDS, HIRANO ZM, DE ARRUDA ME, KANO FS, CARVALHO LH, DE BRITO CF. *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2014 Aug;109(5):641-53. doi: 10.1590/0074-0276130578. Epub 2014 Aug 5. PMID: 25099335; PMCID: PMC4156457.
 - COSTA FT, LOPES SC, ALBRECHT L, ATAÍDE R, SIQUEIRA AM, SOUZA RM, RUSSELL B, RENIA L, MARINHO CR, LACERDA MV. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. **International Journal for Parasitology**. 2012 Nov;42(12):1099-105. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.08.007. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23022617.
 - COWMAN AF, HEALER J, MARAPANA D, MARSH K. Malaria: Biology and Disease. **Cell**. 2016 Oct 20;167(3):610-624. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055. PMID: 27768886.
 - COWMAN AF, TONKIN CJ, THAM WH, DURAISINGH MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. **Cell Host and Microbe**. 2017 Aug 9;22(2):232-245. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.003. PMID: 28799908.
 - COX-SINGH J, DAVIS TM, LEE KS, SHAMSUL SS, MATUSOP A, RATNAM S, RAHMAN HA, CONWAY DJ, SINGH B. *Plasmodium knowlesi* malaria in

- humans is widely distributed and potentially life threatening. **Infectious Diseases Society of America**. 2008 Jan 15;46(2):165-71. DOI: 10.1086/524888. PMID: 18171245; PMCID: PMC2533694.
- COX-SINGH J. Zoonotic malaria: *Plasmodium knowlesi*, an emerging pathogen. **Current opinion in infectious diseases**. 2012 Oct;25(5):530-6. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283558780. PMID: 22710318.
 - CROMPTON PD, MOEBIUS J, PORTUGAL S, WAISBERG M, HART G, GARVER LS, MILLER LH, BARILLAS-MURY C, PIERCE SK. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annual review of immunology**. 2014; 32:157-87. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120220. PMID: 24655294; PMCID: PMC4075043.
 - DA FONSECA F. Plasmódio de primata do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. março 1951. doi: 10.1590/S0074-02761951000100008
 - DA VEIGA GTS, MORIGGI MR, VETTORAZZI JF, MULLER-SANTOS M, ALBRECHT L. *Plasmodium vivax* vaccine: What is the best way to go? **Frontiers in immunology**. 2023 Jan 16; 13:910236. doi: 10.3389/fimmu.2022.910236. PMID: 36726991; PMCID: PMC9885200.
 - DE ALVARENGA DA, DE PINA-COSTA A, DE SOUSA TN, PISSINATTI A, ZALIS MG, SUAREZ-MUTIS MC, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, BRASIL P, DANIEL-RIBEIRO CT, DE BRITO CF. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malaria Journal**. 2015 Feb 18; 14:81. doi: 10.1186/s12936-015-0606-6. PMID: 25889933; PMCID: PMC4342080.
 - DE ARAUJO FC, DE REZENDE AM, FONTES CJ, CARVALHO LH, ALVES DE BRITO CF. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection. **PLoS One**. 2012;7(11): e49871. Doi: 10.1371/journal.pone.0049871. Epub 2012 Nov 21. PMID: 23185469; PMCID: PMC3503861.
 - DE NIZ M, BURDA PC, KAISER G, DEL PORTILHO HA, SPIELMANN T, FRICKKNECHT F, HEUSSLER VT. Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. **Nature reviews. Microbiology**. 2017

- Jan;15(1):37-54. doi: 10.1038/nrmicro.2016.158. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27890922.
- ESCALANTE A, CORNEJO O, ROJAS A, UDHAYAKUMAR V, LAL AA. Assessing the effect of natural selection in malaria parasites. **Trends in Parasitology**. 2004 Aug;20(8):388-95. doi: 10.1016/j.pt.2004.06.002. PMID: 15246323.
 - EXCOFFIER L, LISCHER HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. 2010 May;10(3):564-7. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x. Epub 2010 Mar 1. PMID: 21565059.
 - FANDEUR T, VOLNEY B, PENEAU C, DE THOISY B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. **Parasitology**. 2000 Jan;120 (Pt 1):11-21. doi: 10.1017/s0031182099005168. PMID: 10726261.
 - FERREIRA MU, HARTL DL. *Plasmodium falciparum*: worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). **Experimental parasitology**. 2007 Jan;115(1):32-40. doi: 10.1016/j.exppara.2006.05.003. Epub 2006 Jun 21. PMID: 16797008.
 - Ferreira MU, Zilvermit M, Wunderlic G. Origins, and evolution of antigenic diversity in malaria parasites. **Current molecular medicine**. 2007b Sep;7(6):588-602. doi: 10.2174/156652407781695756. PMID: 17896995.
 - FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**. 2016 May 20;15(1):284. doi: 10.1186/s12936-016-1335-1. PMID: 27206924; PMCID: PMC4875681.
 - FOWKES, F. J. I.; BOEUF, P.; BEESON, J. G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. **Parasitology**. 2016 Feb;143(2):139-53. doi: 10.1017/S0031182015001249. Epub 2016 Jan 7. PMID: 26741253.
 - FRANÇA, C. T. et al. Identification of Highly-Protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. **Elife**, v. 6, p. 1 22, 2017.
 - Fu, Y, W Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics** 133:693-709

-
- FUEHRER HP, CAMPINO S, SUTHERLAND CJ. The primate malaria parasites *Plasmodium malariae*, *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium ovale* spp.: genomic insights into distribution, dispersal, and host transitions. **Malaria Journal**. 2022 May 3;21(1):138. doi: 10.1186/s12936-022-04151-4. PMID: 35505317; PMCID: PMC9066925.
 - GENTON B, D'ACREMONT V, RARE L, BAEA K, REEDER JC, ALPERS MP, MULLER I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Med**. 2008 Jun 17;5(6):e127. doi: 10.1371/journal.pmed.0050127. PMID: 18563961; PMCID: PMC2429951.
 - GILBERGER TW., THOMPSON JK, REED MB, GOOD RT, COWMAN AF. The cytoplasmic domain of the *Plasmodium falciparum* ligand EBA-175 is essential for invasion but not protein trafficking. **The Journal of Cell Biology**. 2003 Jul 21;162(2):317-27. doi: 10.1083/jcb.200301046. PMID: 12876279; PMCID: PMC2172798.
 - GILSON PR, CRABB BS. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. **International journal for parasitology**. 2009 Jan;39(1):91-6. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.09.007. Epub 2008 Oct 11. PMID: 18952091.
 - Gosi, P, S Khusmith, T Khalambaheti, D Lanar, K Schaecher, M Fukuda, S Miller. Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai *Plasmodium vivax* isolates. **Malaria Journal**. 7:112. 2008.
 - GREENWOOD BM, FIDOCK DA, KYLE DE, KAPPE SH, ALONSO PL, COLLINS FH, DUFFY PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of clinical investigation**. 2008 Apr;118(4):1266-76. doi: 10.1172/JCI33996. PMID: 18382739; PMCID: PMC2276780.
 - GRILLET et al. Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications for spillover in the region. **The Lancet Infectious diseases**. 2019 May;19(5): e149-e161. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30757-6. Epub 2019 Feb 21. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2019 Feb 27; PMID: 30799251.

-
- 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.
 - GRUSZCYK J, KANJEE U, CHAN LJ, MENANT S, MALLERET B, LIM NTY, SCHMIDT CQ, MOK YF, LIN KM, PEARSON RD, RANGEL G, SMITH BJ, CALL MJ, WEEKES MP, GRIFFIN MDW, MURPHY JM, ABRAHAM J, SRIPRAWAT K, MENEZES MJ, FERREIRA MU, RUSSEL B, RENIA L, DURAISINGH MT, THAM WH. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. **Science**. 2018 Jan 5;359(6371):48-55. doi: 10.1126/science.aan1078. PMID: 29302006; PMCID: PMC5788258.
 - GUEIRARD P, TAVARES J, THIBERGE S, BERNEX F, ISHINO T, MILON G, FRANKE-FAYARD B, JANSE CJ, MENARD R, AMINO R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010 Oct 26;107(43):18640-5. doi: 10.1073/pnas.1009346107. Epub 2010 Oct 4. PMID: 20921402; PMCID: PMC2972976.
 - GUNALAN K, LO E, HOSTETLER JB, YEWHALAW D, MU J, NEAFSEY DE, YAN G, MILLER LH. Role of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein 1 in invasion of Duffy-null Africans. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2016 May 31;113(22):6271-6. doi: 10.1073/pnas.1606113113. Epub 2016 May 17. PMID: 27190089; PMCID: PMC4896682.
 - GUNASEKERA AM, WICKRAMARACHCHI T, NEAFSEY DE, GANGULI I, PERERA L, PREMARATNE PH, HARTL D, HANDUNNETTI SM, UDAGAMA-RANDENIYA PV, WIRTH DF. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. **Molecular Biology and Evolution**. 2007 Apr;24(4):939-47. doi: 10.1093/molbev/msm013. Epub 2007 Jan 22. PMID: 17244598.
 - HADLEY TJ. Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. **Annual Review of Microbiology**. 1986; 40:451-77. doi: 10.1146/annurev.mi.40.100186.002315. PMID: 3535649.
 - HALDAR K, MURPHY SC, MILNER DA, TAYLOR TE. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annual Review Pathology**. 2007; 2:217-49. doi: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.091913. PMID: 18039099.

-
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41, 95-98 (1999).
 - HAN, J. H. et al. Genetic diversity and neutral selection in *Plasmodium vivax* erythrocyte binding protein correlates with patient antigenicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1 16, 2020.
 - HE, W.-Q. et al. Antibody responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical Malaria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0006987, 15 fev. 2019.
 - HESTER J, CHAN ER, MENARD D, MERCEREAU-PUIJALON O, BARNWELL J, ZIMMERMAN PA, SERRE D. De novo assembly of a field isolate genome reveals novel *Plasmodium vivax* erythrocyte invasion genes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2013 Dec 5;7(12): e2569. doi: 10.1371/journal.pntd.0002569. PMID: 24340114; PMCID: PMC3854868.
 - HOLZ LE, FERNANDEZ-RUIZ D, HEATH WR. Protective immunity to liver-stage malaria. **Clinical & Translational Immunology**. 2016 Oct 21;5(10): e105. doi: 10.1038/cti.2016.60. PMID: 27867517; PMCID: PMC5099428.
 - HOU MM, et al. Vaccination with *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein inhibits parasite growth during controlled human malaria infection. **Science Translational Medicine**. 2023 Jul 12;15(704): eadf1782. doi: 10.1126/scitranslmed.adf1782. Epub 2023 Jul 12. PMID: 37437014; PMCID: PMC7615121.
 - HWANG J, CULLEN KA, KACHUR SP, ARGUIN PM, BAIRD JK. Severe morbidity and mortality risk from malaria in the United States, 1985-2011. **Open Forum Infectious Diseases**. 2014 Jun 30;1(1): ofu034. doi: 10.1093/ofid/ofu034. PMID: 25734104; PMCID: PMC4324198.
 - JOHN GK, DOUGLAS NM, VON SEIDLEIN L, NOSTEN F, BAIRD JK, WHITE NJ, PRICE RN. Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature. **Malaria Journal**. 2012 Aug 17; 11:280. doi: 10.1186/1475-2875-11-280. PMID: 22900786; PMCID: PMC3489597.
 - KANO FS, SANCHEZ BA, DE SOUSA TN, TANG ML, SALIBA J, OLIVEIRA FM, NOGUEIRA PA, GONÇALVES AQ, FONTES CJ, SOARES IS, BRITTO

- CF, ROCHA RS, CARVALHO LH. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine & International Health**. 2012 Aug;17(8):989-1000. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x. Epub 2012 May 30. PMID: 22643072.
- Kho, W, J Chung, E Sim, D Kim, W Chung. Analysis of polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates. **The Korean Journal of Parasitology**. 39:143-150. 2001.
 - KIMURA M. Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. **Nature**. 1977 May 19;267(5608):275-6. doi: 10.1038/267275a0. PMID: 865622.
 - KING CL, MICHON P, SHAKRI AR, MARCOTTY A, STANISIC D, ZIMMERMAN PA, COLE-TOBIAN JL, MUELLER I, CHITNIS CE. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008 Jun 17;105(24):8363-8. doi: 10.1073/pnas.0800371105. Epub 2008 Jun 3. PMID: 18523022; PMCID: PMC2448842.
 - KITCHEN, S. F. The Infection of Reticulocytes by *Plasmodium vivax*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. s1-18, n. 4, p. 347–359, 1 jul. 1938
 - KOCH M, BAUM J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. **Cellular Microbiology**. 2016 Mar;18(3):319-29. doi: 10.1111/cmi.12557. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26663815; PMCID: PMC4819681.
 - KROTOSKI WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1985;79(1):1-11. PMID: 3922096.
 - KROTOSKI WA. The hypnozoite and malarial relapse. **Progress in Clinical Parasitology**. 1989; 1:1-19. PMID: 2491691.
 - LALREMRUATA A, et al. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man, and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. **EBioMedicine**. 2015 Jul 29;2(9):1186-92. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.07.033. PMID: 26501116; PMCID: PMC4588399.

-
- LANGFORD S, et al. *Plasmodium malariae* Infection Associated with a High Burden of Anemia: A Hospital-Based Surveillance Study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2015 Dec 31;9(12): e0004195. doi: 10.1371/journal.pntd.0004195. PMID: 26720002; PMCID: PMC4697806.
 - LAU YL, LEE WC, TAN LH, KAMARULZAMAN A, OMAR SFS, FONG MY, CHEONG FW, MAHMUD R. Acute respiratory distress syndrome and acute renal failure from *Plasmodium ovale* infection with fatal outcome. **Malaria Journal**. 2013 Nov 4; 12:389. doi: 10.1186/1475-2875-12-389. PMID: 24180319; PMCID: PMC4228392.
 - LAURENS MB. RTS, S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. 2020 Mar 3;16(3):480-489. doi: 10.1080/21645515.2019.1669415. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31545128; PMCID: PMC7227679.
 - LIMA BAS, FERNANDES GM, TORRES LM, PIRES CV, ALVES JRS, MOREIRA-NASCIMENTO SL, NASCIMENTO MFA, AFONSO SL, COSTA HL, CERAVOLO IP, SOUSA TN, SOARES IS, NTUMNGIA FB, ADAMS JH, CARVALHO LH, KANO FS. Antibody response-to a new member of the DBL family (EBP2) after a brief *Plasmodium vivax* exposure. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2022 Jun 17;16(6):e0010493. doi: 10.1371/journal.pntd.0010493. PMID: 35714097; PMCID: PMC9205486.
 - LIMA BAS. Antígenos de *Plasmodium vivax* envolvidos na invasão de reticulócitos: avaliação da resposta imune naturalmente adquirida após única exposição ao parasito. **Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou**, 2022.
 - LO E, YEWHALAW D, ZHONG D, ZEMENE E, DEGEFA T, TUSHUNE K, HA M, LEE MC, JAMES AA, YAN G. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria among Duffy-positive and Duffy-negative populations in Ethiopia. **Malaria Journal**. 2015 Feb 19; 14:84. doi: 10.1186/s12936-015-0596-4. PMID: 25884875; PMCID: PMC4340780.
 - LOPEZ C, YEPES-PEREZ Y, HINCAPIE-ESCOBAR N, DIAZ-AREVALO D, PATARROYO MA. What Is Known about the Immune Response Induced by *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidates? **Frontiers in immunology**.

- 2017 Feb 13; 8:126. doi: 10.3389/fimmu.2017.00126. PMID: 28243235; PMCID: PMC5304258.
- MAESTRE A, MUSKUS C, DUQUE V, AGUDELO O, LIU P, TAKAGI A, NTUMNGIA FB, ADAMS JH, SIM KL, HOFFMAN SL, CORRADIN G, VELEZ ID, WANG R. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). **PLoS One**. 2010 Jul 15;5(7): e11437. doi: 10.1371/journal.pone.0011437. PMID: 20664684; PMCID: PMC2896388.
 - MALLERET B, et al. *Plasmodium vivax* binds host CD98hc (SLC3A2) to enter immature red blood cells. **Nature Microbiology**. 2021 Aug;6(8):991-999. doi: 10.1038/s41564-021-00939-3. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34294905.
 - MALLERET B, RÉNIA L, RUSSELL B. The unhealthy attraction of *Plasmodium vivax* to reticulocytes expressing transferrin receptor 1 (CD71). **International Journal for Parasitology**. 2017 Jun;47(7):379-383. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.03.001. Epub 2017 Apr 13. PMID: 28414070.
 - MARTIN-JAULAR L, ELIZALDE-TORRENT A, THOMSON-LUQUE R, FERRER M, SEGOVIA JC, HERREROS-AVILES E, FERNANDEZ-BECERRA C, DEL PORTILHO HA. Reticulocyte-prone malaria parasites predominantly invade CD71hi immature cells: implications for the development of an in vitro culture for *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2013 Dec 1; 12:434. doi: 10.1186/1475-2875-12-434. PMID: 24289105; PMCID: PMC4220676.
 - MAYER DC, JIANG L, ACHUR RN, KAKIBAKI I, GOWDA DC, MILLER LH. The glycophorin C N-linked glycan is a critical component of the ligand for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte receptor BAEBL. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2006 Feb 14;103(7):2358-62. doi: 10.1073/pnas.0510648103. Epub 2006 Feb 6. PMID: 16461900; PMCID: PMC1413722.
 - MCKENZIE, F. E.; JEFFERY, G. M.; COLLINS, W. E. *Plasmodium vivax* blood-stage dynamics. **The Journal of Parasitology**. 2002 Jun;88(3):521-35. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0521: PVBSD]2.0.CO;2. PMID: 12099421; PMCID: PMC2504326.

-
- MEIBALAN E, MARTI M. Biology of Malaria Transmission. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. 2017 Mar 1;7(3):a025452. doi: 10.1101/cshperspect.a025452. PMID: 27836912; PMCID: PMC5334247.
 - MENARD D, et al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010 Mar 30;107(13):5967-71. doi: 10.1073/pnas.0912496107. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20231434; PMCID: PMC2851935.
 - MÉNARD R, TAVARES J, COCKBURN I, MARKUS M, ZAVALA F, AMINO R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nature reviews Microbiology**. 2013 Oct;11(10):701-12. doi: 10.1038/nrmicro3111. PMID: 24037451.
 - MILLER LH, MASON SJ, CLYDE DF, McGINNISS MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **The New England journal of medicine**. 1976 Aug 5;295(6):302-4. doi: 10.1056/NEJM197608052950602. PMID: 778616.
 - MORENO-PÉREZ DA, RUÍZ JA, PATARROYO MA. Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. **Biology of the Cell**. 2013 Jun;105(6):251-60. doi: 10.1111/boc.201200093. Epub 2013 May 2. PMID: 23458497.
 - MOTA MM, et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**. 2001 Jan 5;291(5501):141-4. doi: 10.1126/science.291.5501.141. PMID: 11141568.
 - MUELLER I, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 2009 Sep;9(9):555-66. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70177-X. PMID: 19695492.
 - MUELLER I, ZIMMERMAN PA, REEDERr JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the "bashful" malaria parasites. **Trends in Parasitology**. 2007 Jun;23(6):278-83. doi: 10.1016/j.pt.2007.04.009. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17459775; PMCID: PMC3728836.
 - NEVES DP, MELO AL, LINARDI PM, VITOR RWA. Parasitologia humana. 14ª edição, Rio de Janeiro: **Atheneu**, 2020, 616 p.
 - NICOLETE VC, FRISCHMANN S, BARBOSA S, KING CL, FERREIRA MU. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. **The**

- Journal of Infectious Diseases**. 2016 Nov 15;214(10):1539-1546. doi: 10.1093/infdis/jiw407. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27578850; PMCID: PMC5091372.
- NTUMNGIA, F. B. et al. A novel erythrocyte binding protein of *Plasmodium vivax* suggests an alternate invasion pathway into duffy-positive reticulocytes. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1 5, 2016.
 - NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 30 36, 2012.
 - OBALDIA N 3rd, MEIBALAN E, SA JM, MA S, CLARK MA, MEJA P, MORAES BARROS RR, OTERO W, FERREIRA MU, MITCHELL JR, MILNER DA, HUTTENHOWER C, WIRTH DF, DURASINGH MT, WELLENS TE, MARTI M. Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium vivax* Infection. **mBio**. 2018 May 8;9(3):e00625-18. doi: 10.1128/mBio.00625-18. PMID: 29739900; PMCID: PMC5941073.
 - OLIVEIRA-FERREIRA J, et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**. 2010 Apr 30;9:115. doi: 10.1186/1475-2875-9-115. PMID: 20433744; PMCID: PMC2891813.
 - OLOTU A, et al. Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. **The New England Journal of Medicine**. 2016 Jun 30;374(26):2519-29. doi: 10.1056/NEJMoa1515257. PMID: 27355532; PMCID: PMC4962898.
 - PAN BT, TENG K, WU C, ADAM M, JOHNSTONE RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **The Journal of Cell Biology**. 1985 Sep;101(3):942-8. doi: 10.1083/jcb.101.3.942. PMID: 2993317; PMCID: PMC2113705.
 - PARMLEY, R. T.; HAJDU, I.; DENYS, F. R. Ultrastructural localization of the transferrin receptor and transferrin on marrow cell surfaces. **British Journal of Haematology**, v. 54, n. 4, p. 633 641, ago. 1983.
 - PAYNE RO, et al. Human vaccination against *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. **JCI Insight**. 2017

- Jun 15;2(12):e93683. doi: 10.1172/jci.insight.93683. PMID: 28614791; PMCID: PMC5470884.
- PAYNE, R. O. et al. Human vaccination against *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. **JCI insight**, v. 2, n. 12, p. 1 17, 2017."
 - PEDRO RS, GUARALDO L, CAMPOS DP, COSTA AP, DANIEL-RIBEIRO CT, BRASIL P. Plasmodium vivax malaria relapses at a travel medicine centre in Rio de Janeiro, a non-endemic area in Brazil. *Malar J.* 2012 Jul 28;11:245. doi: 10.1186/1475-2875-11-245. PMID: 22839416; PMCID: PMC3416703.
 - PHILLIPS MA, BURROWS JN, MANYANDO C, VAN HUIJSDUIJNEN RH, VAN VOORHIS WC, WELLS TNC. Malaria. **Nature reviews. Disease primers.** 2017 Aug 3;3:17050. doi: 10.1038/nrdp.2017.50. PMID: 28770814.
 - PRADEL G, FREVERT U. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. **Hepatology.** 2001 May;33(5):1154-65. doi: 10.1053/jhep.2001.24237. PMID: 11343244.
 - PREMARATNE PH, ARAVINDA BR, ESCALANTE AA, UDAGAMA PV. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II (PvDBPII) under unstable transmission and low intensity malaria in Sri Lanka. **Infection, Genetics and Evolution.** 2011 Aug;11(6):1327-39. doi: 10.1016/j.meegid.2011.04.023. Epub 2011 Apr 28. PMID: 21554998.
 - PUTAPORNTIP, C., JONGWUTIWES, S., IWASAKI, T., KANBARA, H. and HUGHES, A. L. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 146, 105-108 (2006).
 - RAJAN A, CHITNIS CE. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999 Nov 23;96(24):14067-72. doi: 10.1073/pnas.96.24.14067. PMID: 10570199; PMCID: PMC24191.
 - RAYNER JC, et al. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. **The Journal of Experimental Medicine.**

- 2001 Dec 3;194(11):1571-81. doi: 10.1084/jem.194.11.1571. PMID: 11733572; PMCID: PMC2193530.
- RIGLAR DT, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. **Cell Host Microbe**. 2011 Jan 20;9(1):9-20. doi: 10.1016/j.chom.2010.12.003. PMID: 21238943.
 - ROESCH C, POPOVICI J, BIN S, RUN V, KIM S, RAMBOARINA S, RAKOTOMALALA E, RAKOTOARISON RL, RASOLOHARIMANANA T, ANDRIAMANANTENA Z, KUMAR A, GUILLOTTE-BLISNICK M, HUON C, SERRE D, CHITNIS CE, VIGAN-WOMAS I, MENARD D. Genetic diversity in two *Plasmodium vivax* protein ligands for reticulocyte invasion. **LOS Neglected Tropical Diseases**. 2018 Oct 22;12(10):e0006555. doi: 10.1371/journal.pntd.0006555. PMID: 30346980; PMCID: PMC6211765.
 - ROZAS J, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**. 2017 Dec 1;34(12):3299-3302. doi: 10.1093/molbev/msx248. PMID: 29029172.
 - 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**. 2015 Jul 4;386(9988):31-45. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60721-8. Epub 2015 Apr 23. Erratum in: **Lancet**. 2015 Jul 4;386(9988):30. PMID: 25913272; PMCID: PMC5626001.
 - RYAN, J. R., STOUTE, J. A., AMON, J., DUNTON, R. F., MTALIB, R., KOROS, J., OWOUR, B., LUCKHART, S., WIRTZ, R. A., BARNWELL, J. W. and ROSENBERG, R. (2006). Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in western Kenya. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 75, 575-581.
 - SAMPATH S, CARRICO C, JANES J, et al. Glycan masking of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein for probing protein binding function and vaccine development. **PLoS Pathogens**. 2013;9(6):e1003420. doi: 10.1371/journal.ppat.1003420. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23853575; PMCID: PMC3681752.

-
- Secretaria de Vigilância em Saúde. Elimina Malária Brasil: Plano Nacional de Eliminação da Malária. **Ministério da Saúde**, 2022. ISBN 978-65-5993-185-9.
 - Secretaria de Vigilância em Saúde. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. Boletim Epidemiológico - **Ministério da Saúde**, 2015. ISSN 2358-9450
 - Secretaria de Vigilância em Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. Boletim Epidemiológico - **Ministério da Saúde**, 2022. ISSN 9352-7864.
 - SILVA-FILHO JL, LACERDA MVG, RECKER M, WASSMER SC, MARTI M, COSTA FTM. *Plasmodium vivax* in Hematopoietic Niches: Hidden and Dangerous. **Trends in Parasitology**. 2020 May;36(5):447-458. doi: 10.1016/j.pt.2020.03.002. Epub 2020 Mar 31. Erratum in: Trends Parasitol. 2020 Jul;36(7):648-649. PMID: 32298632.
 - SIM BK, ORLANDIPA, HAYNES JD, KLOTZ FW, CARTER JM, CAMUS D, ZEGANS ME, CHULAY JD. Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. **The Journal of Cell Biology**. 1990 Nov;111(5 Pt 1):1877-84. doi: 10.1083/jcb.111.5.1877. PMID: 2229177; PMCID: PMC2116314.
 - SINDEN RE. Sexual development of malarial parasites. **Adv Parasitology**. 1983;22:153-216. doi: 10.1016/s0065-308x(08)60462-5. PMID: 6141715.
 - SINGH K, et al. Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a phase I trial. **NPJ Vaccines** (2018) (1):48. doi: 10.1038/s41541-018-0083-3
 - SINGH SK, HORA R, BELRHALI H, CHITINIS CE, SHARMA A. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. **Nature**. 2006 Feb 9;439(7077):741-4. doi: 10.1038/nature04443. Epub 2005 Dec 21. PMID: 16372020.
 - SINKA ME, BANGS MJ, MANGUIN S, RUBIO-PALIS Y, CHAREONVIRIYAPHAP T, COETZEE M, MBOGO CM, HEMINGWAY J, PATIL AP, TEMPERLEY WH, GETHING PW, KABARIA CW, BURKOT TR, HARBACH RE, HAY SI. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites**

- and Vectors**. 2012 Apr 4;5:69. doi: 10.1186/1756-3305-5-69. PMID: 22475528; PMCID: PMC3349467.
- SIQUEIRA AM, et al. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2016 Dec 28;95(6 Suppl):87-96. doi: 10.4269/ajtmh.16-0204. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27708190; PMCID: PMC5201227.
 - SOUSA TN, CERAVOLO IP, FONTES CJT, COUTO A, CARVALHO LH, BRITTO CF. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 2006 Apr;146(2):251-4. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.11.006. Epub 2005 Dec 13. PMID: 16384615.
 - SOUSA TN, KANO FS, DE BRITO CF, CARVALHO LH. The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2014 Aug;109(5):608-17. doi: 10.1590/0074-0276130592. PMID: 25185002; PMCID: PMC4156454.
 - SOUSA TN, TARAZONA-SANTOS EM, WILSON DJ, MADUREIRA AP, FALCÃO PR, FONTES CJ, GIL LH, FERREIRA MU, CARVALHO LH, BRITO CF. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J*. 2010 Nov 22;9:334. doi: 10.1186/1475-2875-9-334. PMID: 21092207; PMCID: PMC3003673.
 - SOUZA-SILVA FA, et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Feb;82(2):185-93. doi: 10.4269/ajtmh.2010.08-0580. PMID: 20133990; PMCID: PMC2813155.
 - SRINIVASAN P, BEATTY WL, DIOUF A, HERRERA R, AMBROGGIO X, MOCH JK, TYLER JS, NARUM DL, PIERCE SK, BOOTHROYD JC, HAYNES JD, MILLER LH. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 9;108(32):13275-80. doi: 10.1073/pnas.1110303108. Epub 2011 Jul 25. PMID: 21788485; PMCID: PMC3156155.

-
- STURM A, AMINO R, VAN DE SAND C, REGER T, RETZLAFF S, RENNENBERG A, KRUEGER A, POLLOK JM, MENARD R, HEUSSLER VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287-90. doi: 10.1126/science.1129720. Epub 2006 Aug 3. PMID: 16888102.
 - SUTHERLAND CJ, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. **The Journal of Infectious Diseases**. 2010 May 15;201(10):1544-50. doi: 10.1086/652240. PMID: 20380562.
 - TA, H. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98
 - TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989 Nov;123(3):585-95. doi: 10.1093/genetics/123.3.585. PMID: 2513255; PMCID: PMC1203831.
 - TANOMSING N, IMWONG M, PUKRITTAYAKAMEE S, CHOTIVANICH K, LOOAREESUWAN S, MAYXAY M, DOLECEK C, HIEN TT, DO ROSARIO VE, AREZ AP, MICHON P, SNOUNOU G, WHITE NJ, DAY NP. Genetic analysis of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from geographically diverse isolates of *Plasmodium malariae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3523-30. doi: 10.1128/AAC.00234-07. Epub 2007 Aug 6. PMID: 17682097; PMCID: PMC2043249.
 - TAVARES J, et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **The Journal of Experimental Medicine**. 2013 May 6;210(5):905-15. doi: 10.1084/jem.20121130. Epub 2013 Apr 22. PMID: 23610126; PMCID: PMC3646492.
 - THAM, W. H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. *Plasmodium vivax* vaccine research - we've only just begun. **International Journal for Parasitology**. 2017 Feb;47(2-3):111-118. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.09.006. Epub 2016 Nov 27. PMID: 27899329.
 - TJITRA E, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Medicine**. 2008 Jun 17;5(6):e128. doi: 10.1371/journal.pmed.0050128. PMID: 18563962; PMCID: PMC2429950.

-
- TONKIN ML, ROQUES M, LAMARQUE MH, PUGNIERE M, DOUGUET D, CRAWFORD J, LEBRUN M, BOULANGER MJ. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. **Science**. 2011 Jul 22;333(6041):463-7. doi: 10.1126/science.1204988. PMID: 21778402.
 - TORRES, L. DE M. Antígenos envolvidos na invasão dos reticulócitos pelo *Plasmodium*: da resposta imune humoral. **Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou**, 2017.
 - TRAN TM, OLIVEIRA-FERREIRA J, MORENO A, SANTOS F, YAZDANI SS, CHITNIS CE, ALTMAN JD, MEYER EV, BARNWELL JW, GALINSKI MR. Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2005 Aug;73(2):244-55. PMID: 16103583.
 - TSUBOI T, KAPPE SH, AL-YAMAN F, PRICKETT MD, ALPERS M, ADAMS JH. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. **Infection and Immunity**. 1994 Dec;62(12):5581-6. doi: 10.1128/iai.62.12.5581-5586.1994. PMID: 7960140; PMCID: PMC303305.
 - Tsuboi, T, S Kappe, F al-Yaman, M Prickett, M Alpers, J Adams. 1994. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. **Infection and Immunity** 62:5581-5586
 - VALIZADEH V, ZAKERI S, MEHRIZI AA, DJADID ND. Is the single variant form of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein-II (PvDBP-II) adequate for inclusion in a PvDBP-II-based vaccine? **Malaria Journal**. 2014 Sep 22;13(Suppl 1):P95. doi: 10.1186/1475-2875-13-S1-P95. PMCID: PMC4179483.
 - VANBUSKIRK KM, et al. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**. 2004a, 190: 1556-1562. 10.1086/424852.
 - VANBUSKIRK KM, SEVOVA E, ADAMS JH. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004b Nov

- 2;101(44):15754-9. doi: 10.1073/pnas.0405421101. Epub 2004 Oct 21. PMID: 15498870; PMCID: PMC524844.
- VERRA F, CHOKEJINDACHAI W, WEEDALL G, POLLEY S, MWANGI T, MARSH K, CONWAY D. Contrasting signatures of selection on the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 2006 Oct;149(2):182-90. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.05.010. Epub 2006 Jun 22. PMID: 16837078.
 - VLACHOU D, ZIMMERMANN T, CANTERA R, JANSE CJ, WATERS AP, KAFATOS FC. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. **Cell Microbiology**. 2004 Jul;6(7):671-85. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00394.x. PMID: 15186403.
 - VOLNEY B, POULIQUEN JF, DE THOISY B, FANDEUR T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. **Acta Trop**. 2002 Apr;82(1):11-23. doi: 10.1016/s0001-706x(02)00036-0. PMID: 11904099.
 - Welch, 1897 *P. falciparum*
 - WHITE NJ, PUKRITTAYAKAMEE S, HIEN TT, FAIZ MA, MOKUOLU OA, DONDORP AM. Malaria. **Lancet**. 2014 Feb 22;383(9918):723-35. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0. Epub 2013 Aug 15. PMID: 23953767.
 - WHITE NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**. 2011 Oct 11;10:297. doi: 10.1186/1475-2875-10-297. PMID: 21989376; PMCID: PMC3228849.
 - WHITE, N. J. et al. Comparison of characteristics of admitted emergency department patients requiring cardiopulmonary resuscitation in the ICU and non-ICU setting. **Emergency Medicine Journal**, v. 25, n. 2, p. 83-7, Feb 2008.
 - Wijeyesakere, S, R Richardson, J Stuckey. 2007. Modeling the tertiary structure of the patatin domain of neuropathy target esterase. **Protein J** 26:165-172
 - WONKIDAKARN S, MCHENRY AM, SATTABONGKOT J, ADAMS JH, CHOOTONG P. Strain-Transcending Inhibitory Antibodies against Homologous and Heterologous Strains of Duffy Binding Protein region II.

-
- PLoS One.** 2016 May 4;11(5):e0154577. doi: 10.1371/journal.pone.0154577. PMID: 27145131; PMCID: PMC4856259.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report** 2016.
 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report** 2019.
 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report** 2020.
 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report** 2021.
 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report** 2022.
 - Wright, S. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability within and among Natural Populations. 1978. **University of Chicago Press**, Chicago.
 - XAINLI, J., ADAMS, J. and KING, C. (2000). The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 111, 253-260. "
 - XAINLI, J., COLE-TOBIAN, J. L., BAISOR, M., KASTENS, W., BOCKARIE, M., YAZDANI, S. S., CHITNIS, C. E., ADAMS, J. H. and KING, C. L. Epitopespecific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infection and Immunity**, 71, 2508-2515 (2003).
 - ZIELER, H.; DVORAK, J. A. Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2000 Oct 10;97(21):11516-21. doi: 10.1073/pnas.97.21.11516. PMID: 11027351; PMCID: PMC17232.
 - ZIMMERMAN PA, FERREIRA MU, HOWES RE, MERCEREAU-PIUIJALON O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. **Adv Parasitol.** 2013;81:27-76. doi: 10.1016/B978-0-12-407826-0.00002-3. PMID: 23384621; PMCID: PMC3728992.

9. ANEXO I

Tabela suplementar 1. Frequências dos aminoácidos mutados no domínio DBL da *Erythrocyte binding protein 2 (EBP2)* de *Plasmodium vivax*. A primeira letra representa o aminoácido na sequência referência C127 (código de acesso KC987954), o número é a posição que ele se encontra e a outra letra o aminoácido substituto. É possível observar a frequência que cada mutação de aminoácidos aparece nas amostras dos oito países avaliados. nsSNP: substituições não-sinônimas. Amostras: Camboja (CAM, n = 150) e Madagascar (MAD, n = 69) (Roesh *et al.*, 2018); Mianmar (MY, n = 10), Papua-Nova Guiné (PNG, n = 16), Coréia do Sul (SK, n = 10), Tailândia (THA, n = 72), Vietnã (VT, n = 25) (Han *et al.*, 2020); Brasil (BRA, n = 71).

nsSNP*	Frequência								Mundo
	BRA	CAM	MAD	MY	PNG	SK	THA	VT	
H87P				3					3
D148Y	12				4		4	2	22
S180L							1		1
N200K	17		1						18
C219S	12		13		3		3		31
N233K	4	11	1	3		2	6	4	31
Q248H							1		1
D268N	4			3	1	4			12
G303R	10								10
E306K		26		2			4		32
D311N	10		12	3	2	6	20	8	61
K314N					1				1
E322K	7	31	3		3	3	10	4	61
G335X						4			4
K336X						4			4
E337X						4			4
E353K	9								9
Q377K							1		1
L389X								1	1
L390X								1	1
Y408H							1		1
I413T								1	1
T421I		4		2			4		10

Haplótipo	Número de Haplótipos								
	BRA	CAM	MAD	MY	PNG	SK	THA	VT	Mundo
16								1	1
17								1	1
18		8	5		2		7	2	24
19								1	1
20							1		1
21							1		1
22		4		2			3		9
23							7		7
24							1		1
25							1		1
26							2		2
27							1		1
28							2		2
29							1		1
30		2					2		4
31							1		1
32			13				2		15
33							1		1
34						1			1
35					1				1
36					1				1
37				1					1
38				1					1
39				1					1
40		3		2					5
41		2							2
42		2							2
N° Total de Haplótipos	15	10	7	6	6	5	20	7	-