

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**GUSTAVO PEREIRA CARDOSO DE OLIVEIRA**

**ANTICORPOS DIGIRIDOS A ANTÍGENOS PRÓPRIOS DO  
HOSPEDEIRO E SUA RELAÇÃO COM A ANEMIA EM  
INFECCÕES POR *Plasmodium vivax***

Belo Horizonte

2024

GUSTAVO PEREIRA CARDOSO DE OLIVEIRA

**ANTICORPOS DIGIRIDOS A ANTÍGENOS PRÓPRIOS  
DO HOSPEDEIRO E SUA RELAÇÃO COM A ANEMIA  
EM INFECÇÕES POR *Plasmodium vivax***

Tese 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 Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érika Martins Braga

Belo Horizonte

2024

043

Oliveira, Gustavo Pereira Cardoso de.

Anticorpos dirigidos a antígenos próprios do hospedeiro e sua relação com a anemia em infecções por *Plasmodium vivax* [manuscrito] / Gustavo Pereira Cardoso de Oliveira. – 2024.

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

Orientadora: Prof.a Dr.a Érika Martins Braga.

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

1. Parasitologia. 2. *Plasmodium vivax*. 3. Anemia. 4. Autoanticorpos. I. Braga, Érika Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



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

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TESE 355/2024/04**

**TÍTULO DA TESE: "ANTICORPOS DIRIGIDOS A ANTÍGENOS PRÓPRIOS DO HOSPEDEIRO E SUA RELAÇÃO COM A ANEMIA EM INFECÇÕES POR PLASMODIUM VIVAX"**

**ALUNO: GUSTAVO PEREIRA CARDOSO DE OLIVEIRA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **cinco de abril de 2024**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

**Gregório Guilherme Almeida**

Membro externo - IRR/FIOCRUZ - BH

**Letusa Albrecht**

Membro externo - Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná

**Fabiana Simão Machado**

Membro interno - UFMG

**Flávio Almeida Amaral**

Membro interno - UFMG

**Érika Martins Braga**

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 05 de abril de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Erika Martins Braga, Professora do Magistério Superior**, em 09/04/2024, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gregório Guilherme Almeida, Usuário Externo**, em 09/04/2024, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 10/04/2024, às 09:33, 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 **Letusa Albrecht, Usuário Externo**, em 11/04/2024, às 12:04, 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 **Fabiana Simão Machado, Professora do Magistério Superior**, em 11/04/2024, às 12:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3147436** e o código CRC **DEF82879**.

Referência: Processo nº 23072.218974/2024-85

SEI nº 3147436

Trabalho realizado no Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érika Martins Braga. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Projeto (404365/2016-7) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-00361-16); aprovado no Comitê de Ética (CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481) e contou com a colaboração da Dr.<sup>a</sup> Andréa Teixeira de Carvalho (Instituto René Rachou – FIOCRUZ/MG) e da Dr.<sup>a</sup> Ana Rodriguez (New York University, Nova Iorque, EUA).

Aos meus pais, Telma e Aléxis, por todo apoio e amor incondicionais durante toda a  
minha trajetória acadêmica e científica.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érika Martins Braga, minha “mãe científica”, por todos os ensinamentos, pela confiança e pelas oportunidades. Agradeço imensamente por ter confiado em mim, como pessoa e estudante. Obrigado pelos puxões de orelha, pelos elogios e pela amizade.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Rodriguez, da New York University, minha orientadora durante o período sanduíche, pelo acolhimento, ensinamentos e disponibilidade.

À Dr.<sup>a</sup> Andréa Teixeira de Carvalho por ter colaborado neste projeto e ter cedido os anticorpos e os reagentes para a realização dos ensaios de citometria. Além de grande ajuda para interpretação e trabalho com os dados desse experimento.

Ao CNPq e à FAPEMIG por financiarem este projeto.

À CAPES pela bolsa de doutorado e também pela bolsa do doutorado sanduíche através do Programa Institucional de Internacionalização (PrInt).

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG por aceitar meu projeto, dando-me todo o apoio para obtenção do título de doutor.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Parasitologia por participarem da minha formação como parasitologista.

À Sumara e Sibebe, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pelo carinho, atenção e ajuda.

Ao Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda (FMTAM), bem como às suas respectivas equipes de trabalho, por fornecerem os plasmas dos pacientes e os resultados do hemograma, além das informações demográficas e clínicas dos pacientes com malária.

A todos os pacientes que, gentilmente, cederam amostras em prol da pesquisa, e sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

À Plataforma Multiusuário de Citometria de Fluxo do Instituto René Rachou, em especial para as técnicas Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz e Dayane Andriotti Otta por todo apoio prestado no momento da aquisição das amostras.

Ao pessoal do Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores, em especial à Maria Beatriz, Armanda e Ketlen por todo apoio e ajuda durante o período em que fiquei fazendo experimentos na Fiocruz/MG.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Héliida Monteiro de Andrade, como coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e também por disponibilizar seu espectrofotômetro e fotodocumentador para que meus experimentos fossem realizados.

À Aline Marzano Miranda pelas trocas científicas, por toda ajuda em todos meus experimentos de bancada, mas, principalmente, por toda a amizade e apoio emocional durante todo o período do doutorado.

À Margaux Sica por todo o auxílio durante o período sanduíche, mas também pelo carinho e acolhimento.

À Dr.<sup>a</sup> Vanessa Gomes Fraga pelo auxílio laboratorial, por ter sintetizado os peptídeos solúveis e a membrana de *Immunoblot*, mas também pela amizade e companheirismo nesse pouco tempo compartilhando o mesmo laboratório.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniella Castanheira Bartholomeu por todo carinho, conselhos científicos e paciência desde que juntamos os laboratórios de Malária e Genômica de Parasitos.

À Dr.<sup>a</sup> Luiza Carvalho Mourão, minha coorientadora do mestrado, mas que se tornou uma verdadeira amiga. Sou muito grato pelo tempo que convivemos juntos no laboratório e por todos os ensinamentos que tive com você.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liza Figueiredo Felicori Vilela por ter me auxiliado nas análises *in silico* das porções transmembrana da proteína *band 3*.

Aos atuais e ex-colegas e amigos do ex-Laboratório de Malária, Luiz, Pedro, Letícia, Vitória, Regiane, Beatriz e Lis pela excelente convivência, amizade e companheirismo.

Aos atuais colegas do novo Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos, Samuel, Laila, Nathan, Gabrielle, Ivens, Carlos, Beatriz, Victor e David pela excelente convivência nesse pouco mais de um ano de laboratório novo.

Aos colegas do Rodriguez's Lab, Juan, Claudia, Marilyn, Kelly, Mariana, Renate e Nathalie pela ótima convivência durante o período de sanduíche

Aos amigos pessoais e que também seguem a carreira científica, Andreza, Beatriz, Igor, Natália, Sabryna, e Thais por sempre compartilharem comigo da amizade, companheirismo e por me ajudarem nos momentos pessoais e científicos.

Aos meus avós, tios e primos por todo o carinho, por acreditarem em meu potencial e por me apoiarem sempre. Em especial, à minha tia Taís que, gentilmente, fez a revisão textual deste documento. E também minha tia Tânia e meu primo David que me acolheram durante o período sanduíche.

A todos os meus amigos de infância, ensino médio, faculdade e de outras bandas, por sempre estarem comigo nos momentos bons e ruins.

Aos meus pais, Telma e Aléxis, pois sem eles eu não teria conseguido fazer o mestrado e, muito menos, o doutorado. Por todo amor e apoio incondicional que me deram durante minha jornada científica.

“Contra traumas e frustrações que a vida nos impõe, o melhor remédio é uma alma controlada por um grande sonho”

Augusto Cury

## RESUMO

Uma das principais complicações de infecções por *Plasmodium vivax* é a anemia. O ciclo biológico do parasito envolve a destruição de eritrócitos infectados, mas apenas isso não justificaria o quadro anêmico apresentado por pacientes com malária vivax. Isso se deve ao fato de que esta espécie invade exclusivamente reticulócitos, que compõem cerca de 1% das células sanguíneas circulantes. Mediante a isso, diversos estudos propuseram que mecanismos autoimunes, decorrentes da infecção, poderiam estar correlacionados com a destruição de eritrócitos não infectados, gerando um quadro de anemia. Algumas moléculas de eritrócitos foram identificadas como possíveis alvos de autoanticorpos gerados por células autorreativas, como é o caso da *band 3* e da fosfatidilserina. Assim, a partir de uma abordagem sorológica, avaliamos os níveis de anticorpos contra moléculas próprias de eritrócitos, bem como autoanticorpos dirigidos a ácidos nucleicos e eritrócitos saudáveis e íntegros. Nossos dados demonstram que pacientes anêmicos (Hb < 12 g/dL), infectados por *P. vivax*, possuem níveis elevados de anticorpos contra estas moléculas, significativamente maiores do que os pacientes sem um quadro de anemia. Além disso, os níveis destes anticorpos correlacionam-se negativamente com os níveis de hemoglobina e hematócrito desses indivíduos. Utilizando a Análise de Componentes Principais, verificamos que a presença destes anticorpos está associada à infecção, porém não é influenciada pela resposta específica anti-parasitária (mensurada pela presença e níveis de anticorpos contra a proteína da merozoítos, a PvMSP-1<sub>19</sub>), nem pela parasitemia e exposição prévia à malária. Para confirmar a opsonização destes anticorpos em eritrócitos saudáveis e avaliar o possível efeito destes no bloqueio dos canais iônicos da *band 3*, realizamos ensaios de citometria de fluxo na presença ou não de H<sub>2</sub>DIDs. Na presença deste bloqueador do canal iônico da *band 3*, observou-se um aumento da opsonização por anticorpos oriundos de pacientes infectados, com ou sem anemia. Além disso, apenas os níveis de anticorpos anti-*band 3* foram os únicos que se correlacionaram positivamente com a taxa de opsonização de eritrócitos não infectados. Com isso, realizamos um ensaio de *Immunoblot*, utilizando a sequência de completa de aminoácidos que compõem a proteína *band 3* a fim de se determinar as porções mais reconhecidas por anticorpos presentes nos plasmas de indivíduos anêmicos. Assim, selecionamos dois peptídeos promissores que correspondem a duas porções distintas da proteína, uma intracelular e outra relacionada ao canal iônico, e que são reconhecidas significativamente por pacientes anêmicos infectados por *P. vivax*. Os dados gerados contribuem para o entendimento dos mecanismos determinantes da anemia na malária vivax e ampliam a compreensão sobre o espalhamento de epítopos da proteína *band 3* com a formação de neoantígenos, durante infecções por *P. vivax*.

**Palavras-chave:** *Plasmodium vivax*, anemia, autoanticorpos, *band 3*, espalhamento de epítopos.

## ABSTRACT

One of the major complications of *Plasmodium vivax* infection is anemia. The parasite's biological cycle involves the destruction of infected erythrocytes, but this alone would not justify the anemic condition presented by vivax malaria patients. This is because this species exclusively invades reticulocytes, which make up about 1% of circulating blood cells. Consequently, several studies have proposed that autoimmune mechanisms resulting from the infection could be correlated with the destruction of uninfected erythrocytes, leading to anemia. Some erythrocyte molecules have been identified as potential targets of autoantibodies generated by self-reactive cells, such as band 3 and phosphatidylserine. Thus, employing a serological approach, we evaluated antibody levels against erythrocyte own molecules, as well as autoantibodies directed towards nucleic acids and healthy, intact erythrocytes. Our data demonstrates that anemic patients (Hb < 12 g/dL) infected with *P. vivax* have significantly higher levels of antibodies against these molecules compared to patients without anemia. Additionally, these antibody levels correlate negatively with the hemoglobin and hematocrit levels of these individuals. Using Principal Component Analysis, we found that the presence of these antibodies is associated with infection but is not influenced by the specific anti-parasitic response (measured by the presence and levels of antibodies against one merozoite protein, the PvMSP-1<sub>19</sub>), nor by parasitemia and previous exposure to malaria. To confirm the opsonization of these antibodies in healthy erythrocytes and evaluate their possible effect on blocking band 3 ion channels, we conducted flow cytometry assays in the presence or absence of H<sub>2</sub>DIDs. In the presence of this band 3 ion channel blocker, there was an increase in opsonization by antibodies from infected patients, with or without anemia. Furthermore, only anti-band 3 antibody levels correlated positively with the opsonization rate of uninfected erythrocytes. Accordingly, we conducted an Immunoblot assay using the complete amino acid sequence that comprises the band 3 protein to determine the most recognized portions of this protein by antibodies present in the plasma of anemic individuals. Thus, we selected two promising peptides corresponding to two distinct portions of the protein, one intracellular and the other related to the ion channel, which are significantly recognized by anemic patients infected with *P. vivax*. The generated data contribute to understanding the determinants of anemia in vivax malaria and enhance the knowledge of the epitope spreading of band 3 protein with the formation of neoantigens during *P. vivax* infection.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, anemia, autoantibodies, band 3, epitope spreading.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Países endêmicos para a malária e seu <i>status</i> no ano de 2022.....	18
Figura 2 – Mapa de risco de transmissão de malária, por município, no Brasil, em 2023.....	20
Figura 3 – Ciclo biológico de <i>Plasmodium vivax</i> .....	21
Figura 4 – Possíveis mecanismos imunológicos envolvidos no surgimento da anemia em infecções por <i>P. vivax</i> .....	38
Figura 5 – Anticorpos IgG anti-eritrócitos detectados nos plasmas dos indivíduos estudados.....	61
Figura 6 – Correlação entre a resposta de IgG anti-eritrócitos e parâmetros hematológicos e parasitológico dos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> .....	62
Figura 7 – Resposta de IgG detectada nos indivíduos dos grupos estudados frente à proteína <i>band 3</i> .....	63
Figura 8 – Correlação entre a resposta de IgG anti- <i>band 3</i> e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> .....	64
Figura 9 – Resposta anti-PS detectada no plasma de indivíduos dos grupos estudados.....	65
Figura 10 – Correlação entre a resposta de IgG anti-PS e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> .....	66
Figura 11 – Níveis de IgG anti-DNA nos indivíduos dos grupos estudados.....	67
Figura 12 – Correlação entre a resposta de IgG anti-DNA e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> .....	68
Figura 13 – Níveis de anticorpos anti- <i>PvMSP-119</i> nos plasmas dos grupos estudados.....	69
Figura 14 – Correlação entre a resposta de IgG anti- <i>PvMSP-119</i> e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> .....	70
Figura 15 – <i>Heatmap</i> representativo da resposta de cada indivíduo para cada autoantígeno avaliado.....	71
Figura 16 – PCA da reação aos autoantígenos em infecções por <i>P. vivax</i> e em indivíduos saudáveis.....	74
Figura 17 – Média $\pm$ desvio padrão dos <i>scores</i> referentes aos quatro primeiros CPs.....	75

Figura 18 – Correlações entre os <i>scores</i> do CP1 e CP2 e os parâmetros indicativos de infecção.....	76
Figura 19 – PCA dos antígenos avaliados entre os indivíduos com infecção patente por <i>P. vivax</i> .....	78
Figura 20 – Média $\pm$ desvio padrão dos <i>scores</i> referentes aos quatro primeiros CPs dos indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> .....	79
Figura 21 – Correlações entre os <i>scores</i> do CP1 e os parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> .....	80
Figura 22 – Correlações entre os <i>scores</i> do CP2 e os parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> .....	81
Figura 23 – Correlação entre a resposta específica anti- <i>P. vivax</i> e a resposta anti- <i>band 3</i> .....	82
Figura 24 – Estratégia de <i>gating</i> utilizada para cálculo do MFI e da frequência....	84
Figura 25 – Diferença na intensidade mediana de fluorescência de anticorpos IgG ligados a eritrócitos.....	85
Figura 26 – Diferença na intensidade mediana de fluorescência antes e após adição de H <sub>2</sub> DIDS.....	86
Figura 27 – Correlações entre a MFI de eritrócitos de indivíduos não infectados e a resposta anti- <i>band 3</i> e anti-DNA.....	88
Figura 28 – Modelo estrutural da proteína <i>band 3</i> .....	98
Figura 29 – Esquema da troca de íons pelos eritrócitos durante o processo de respiração.....	99
Figura 30 – Predições <i>in silico</i> das porções transmembrana e dos epítomos lineares de células B da proteína <i>band 3</i> .....	108
Figura 31 – <i>Immunoblot</i> dos peptídeos representativos de toda a sequência de aminoácidos da proteína <i>band 3</i> (PDB: 4YZF).....	110
Figura 32 – Estruturas secundárias preditas dos peptídeos DF26 e M20 e a localização deles na estrutura predita da proteína inteira.....	116
Figura 33 – Resposta de IgG ao peptídeo M20.....	117
Figura 34 – Resposta de IgG ao peptídeo DF26.....	118
Figura 35 – Correlação entre a resposta de IgG anti-M20 e anti-DF26 e parâmetros hematológicos.....	119
Figura 36 – Correlações entre a resposta de IgG contra os peptídeos testados e a resposta anti- <i>band 3</i> .....	120

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros hematológicos, parasitológicos e demográficos dos pacientes com infecção patente por <i>P. vivax</i> .....	59
<b>Tabela 2</b> – <i>Eigenvalues</i> e percentual de inércia explicado por cada CP da PCA realizada para todos os antígenos testados.....	72
<b>Tabela 3</b> – Variáveis incluídas na PCA e sua contribuição para os dois eixos derivados.....	73
<b>Tabela 4</b> – <i>Eigenvalues</i> e percentual de inércia explicado por cada CP da PCA realizada para resposta aos antígenos testados entre os pacientes com infecção por <i>P. vivax</i> .....	77
<b>Tabela 5</b> – Variáveis incluídas na PCA e sua contribuição para os dois eixos derivados.....	77
<b>Tabela 6</b> – Peptídeos selecionados e seus respectivos epítomos preditos <i>in silico</i> .....	111
<b>Tabela 7</b> – Alinhamentos da sequência dos peptídeos com o proteoma de outros organismos.....	112
<b>Tabela 8</b> – Propriedades físico-químicas dos dois peptídeos selecionados para a síntese solúvel.....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BCR</b>	– Receptor de Células B
<b>BSA</b>	– Albumina Sérica Bovina
<b>CD</b>	- <i>Cluster</i> de diferenciação
<b>CP</b>	– Componente Principal
<b>DAMPs</b>	– Padrões Moleculares Associados ao Dano
<b>DARC</b>	- Duffy <i>antigen/receptor for chemokines</i>
<b>DDAO</b>	– 7-hydroxy-9H(1,3-dichloro-9,9) dimethylacridin-2-one
<b>DMSO</b>	- Dimetilsufóxido
<b>ELISA</b>	– <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FcR</b>	– Receptor Fc
<b>GPI</b>	– Glicosilfosfatidilinositol
<b>IFN</b>	– Interferon
<b>IL</b>	– Interleucina
<b>IPA</b>	– Incidência Parasitária Anual
<b>IR</b>	– Índice de Reatividade
<b>MHC</b>	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>MSP</b>	– Proteína de Superfície de Merozoíto
<b>nf</b>	– Fator Nuclear
<b>NK</b>	– <i>Natural Killer</i>
<b>OPD</b>	– <i>o-phenylenediamine dihydrochloride substrate</i>
<b>OMS</b>	– Organização Mundial da Saúde
<b>PAMPs</b>	– Padrões Moleculares Associados a Patógenos
<b>PBMCs</b>	– Células Mononucleares de Sangue Periférico
<b>PBS</b>	– Tampão fosfato-salina
<b>PBST</b>	– Tampão fosfato-salina 0,05% Tween
<b>PBST-BSA</b>	– Tampão fosfato-salina 0,05% Tween + Albumina Sérica Bovina
<b>PCA</b>	– Análise de Componentes Principais
<b>PDB</b>	- <i>Protein Data Bank</i>
<b>PfEMP-1</b>	– Proteína 1 de Membrana de <i>P. falciparum</i>
<b>PfGAMA</b>	- Antígeno micronêmico ancorado ao GPI de <i>P. falciparum</i>
<b>PfGARP</b>	- Proteína rica em ácido glutâmico de <i>P. falciparum</i>

<b><i>Pf</i>MSP-1</b>	- Proteína 1 de superfície de merozoíto de <i>P. falciparum</i>
<b><i>Pf</i>TCTP</b>	- <i>P. falciparum translationally controlled tumor protein</i>
<b><i>Pf</i>TRAP</b>	- Proteína Adesiva Relacionada à Trombospondina de <i>P. falciparum</i>
<b>PS</b>	- Fosfatidilserina
<b><i>Pv</i>DBP</b>	- Duffy <i>binding protein</i> de <i>P. vivax</i>
<b><i>Pv</i>GAMA</b>	- Antígeno micronêmico ancorado ao GPI de <i>P. vivax</i>
<b><i>Pv</i>MSP-1</b>	- Proteína 1 de superfície de merozoíto de <i>P. vivax</i>
<b><i>Pv</i>TRAG</b>	- Antígenos Ricos em Triptofano de <i>P. vivax</i>
<b>SVS</b>	- Secretaria de Vigilância em Saúde
<b>TCR</b>	- Receptor de Células T
<b>TLR9</b>	- Receptor do tipo <i>toll 9</i>
<b>TM</b>	- Transmembrana
<b>TNF</b>	- Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. Situação atual da malária no mundo e no Brasil.....	18
1.2. Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.....	21
1.3. Patogênese da malária vivax .....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. CAPÍTULO 1: AUTOANTÍGENOS E SUAS RELAÇÕES COM A ANEMIA E INFECCÕES POR <i>P. VIVAX</i> .....	30
3.1 Autoimunidade em infecções por <i>Plasmodium</i> spp .....	30
3.1.1. Anemia em infecções por <i>Plasmodium vivax</i> .....	36
3.2. OBJETIVOS.....	40
3.2.1. Objetivo geral: .....	40
3.2.2. Objetivos específicos: .....	40
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.3.1. Revisão integrativa .....	41
3.3.2. Critérios de busca.....	41
3.3.3. Área e população de estudo .....	41
3.3.4. Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – ELISA). 43	
3.3.5. Ensaio de Citometria de Fluxo .....	45
3.3.6. Análise dos dados .....	47
3.4. RESULTADOS.....	49
3.4.1. Revisão bibliográfica publicada na <i>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology</i> .....	49
3.4.2. Parâmetros clínicos, parasitológicos e demográficos dos pacientes infectados por <i>P. Vivax</i> .....	59
3.4.3. Detecção de autoanticorpos IgG no plasma de pacientes infectados por <i>P. vivax</i> e correlações com parâmetros hematológicos e parasitológicos.....	60
3.4.4. Dinâmica correlacional dos autoanticorpos durante infecções por <i>P. vivax</i> 71	
3.4.5. Intensidade de ligação de anticorpos purificados dos diferentes grupos estudados a eritrócitos de doadores infectados e não infectados .....	83
3.4.6. Diferença na opsonização de anticorpos antes e após adição de H <sub>2</sub> DIDs em eritrócitos .....	85
3.4.7. Correlações entre eritrócitos opsonizados e resposta a autoantígenos.....	87
3.5. DISCUSSÃO .....	89
4. CAPÍTULO 2: EPÍTOPOS DA PROTEÍNA <i>BAND 3</i> RECONHECIDOS POR AUTOANTICORPOS DE PACIENTES ANÊMICOS INFECTADOS POR <i>P. VIVAX</i> ...	96
4.1.1. Proteína <i>band 3</i> (AE1/SLC4A1) .....	96

4.1.2.	Interações entre <i>Plasmodium</i> spp e a proteína <i>band 3</i> .....	100
4.2.	OBJETIVOS .....	103
4.2.1.	Objetivo geral .....	103
4.2.2.	Objetivos específicos .....	103
4.3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	104
4.3.1.	Predições <i>in silico</i> de epítomos de células B e porções transmembrana da proteína <i>band 3</i> .....	104
4.3.2.	<i>Immunoblot</i> .....	104
4.3.3.	Seleção dos peptídeos para a síntese solúvel .....	105
4.3.4.	ELISA dos peptídeos selecionados.....	106
1.5.6.	Análise dos dados .....	106
4.4.	RESULTADOS.....	107
4.4.1.	Predição de epítomos de células B e porções transmembrana da proteína <i>band 3</i> .....	107
4.4.2.	Principais peptídeos da proteína <i>band 3</i> reconhecidos por autoanticorpos de pacientes anêmicos infectados por <i>P. vivax</i> .....	108
4.4.3.	Predição <i>in silico</i> de epítomos de células B e alinhamento das sequências dos peptídeos selecionados.....	110
4.4.4.	Predição estrutural e localização estrutural dos peptídeos na sequência da proteína <i>band 3</i> .....	113
4.4.5.	ELISA com os peptídeos selecionados e correlações entre parâmetros clínicos e resposta anti- <i>band 3</i> .....	115
4.5.	DISCUSSÃO.....	120
5.	CONCLUSÕES .....	124
6.	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	125
	REFERÊNCIAS .....	126

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária causada por parasitos do gênero *Plasmodium*. Atualmente, cinco espécies são responsáveis pela malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (com duas subespécies, *P. ovale curtisi* e *P. ovale walikeri*) (SUTHERLAND et al., 2010) e *Plasmodium knowlesi*, espécie com perfil de transmissão zoonótico e que infecta naturalmente primatas do gênero *Macaca* no sudeste asiático (COX-SINGH et al., 2008; SINGH; DANESHVAR, 2013). Nos últimos anos, foi demonstrado que *Plasmodium simium* (BRASIL et al., 2017) e *Plasmodium cynomolgi* (TA et al., 2014), espécies que infectam naturalmente primatas não-humanos endêmicos do Brasil e Sudeste Asiático, respectivamente, também têm a capacidade de infectar humanos. No entanto, o impacto epidemiológico destas espécies ainda não está completamente estabelecido.

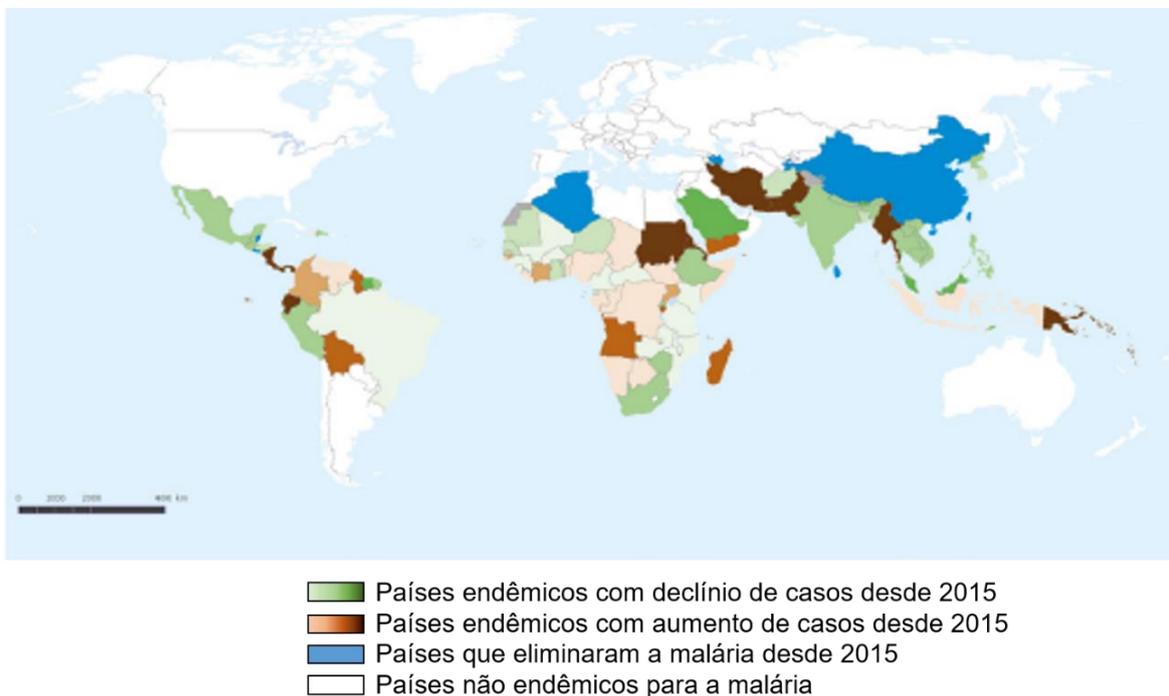
Todas as espécies de *Plasmodium*, responsáveis pela malária humana, apresentam ciclo biológico heteroxeno e são transmitidas pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, popularmente conhecidos no Brasil como mosquito-prego. Mais de 70 espécies desse mosquito são consideradas potenciais vetores de malária em todo o mundo (SINKA et al., 2012); no entanto, as espécies de maior relevância no contexto brasileiro e sul-americano são: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *Anopheles albitalis* e *Anopheles aquasalis* (SINKA et al., 2012).

Com relação às manifestações clínicas, a malária pode ser classificada como malária não complicada ou grave, dependendo dos sintomas e dos achados laboratoriais dos indivíduos infectados (COWMAN et al., 2016; WHITE et al., 2014). A malária não complicada, quadro mais comum da doença, é caracterizada por febre forte e irregular, calafrio, tremedeira, sudorese intensa, dores de cabeça, fadiga, dores musculares, desconforto abdominal, náusea, vômito, anemia moderada e leve hepatoesplenomegalia (COWMAN et al., 2016; WHITE et al., 2014), bem como convulsões generalizadas que também podem ocorrer, principalmente nas infecções por *P. falciparum* (WHITE et al., 2014). O aumento da gravidade da malária está associado a fatores do parasito, como a espécie, cepa e virulência, e às características do hospedeiro, como a idade, nutrição, genética, imunidade prévia e coinfeções. Casos clínicos resultantes em malária grave são mais comuns em infecções por *P. falciparum*, embora também possam ocorrer em

infecções por *P. vivax* (NAING et al., 2014; RAHIMI et al., 2014; ROGERSON; CARTER, 2008; SINGH et al., 2011; TJITRA et al., 2008) e por *P. knowlesi* (COX-SINGH et al., 2008; MILLAR; COX-SINGH, 2015).

### 1.1. Situação atual da malária no mundo e no Brasil

A malária é uma doença endêmica em mais de 85 países localizados na faixa tropical e subtropical do globo (WHO, 2023) (**Figura 1**). Os principais fatores que explicam a prevalência desta doença, nessas áreas, são as condições climáticas que propiciam a formação dos criadouros dos vetores. Além disso, a situação socioeconômica desfavorável nessas regiões contribui para a persistência da malária, devido à escassez de recursos destinados ao diagnóstico e tratamento. Isso, por sua vez, resulta no aumento do número de casos e no surgimento de cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes aos antimaláricos atuais, bem como na elevação da resistência dos vetores aos inseticidas (WHITE et al., 2014; WHO, 2023).



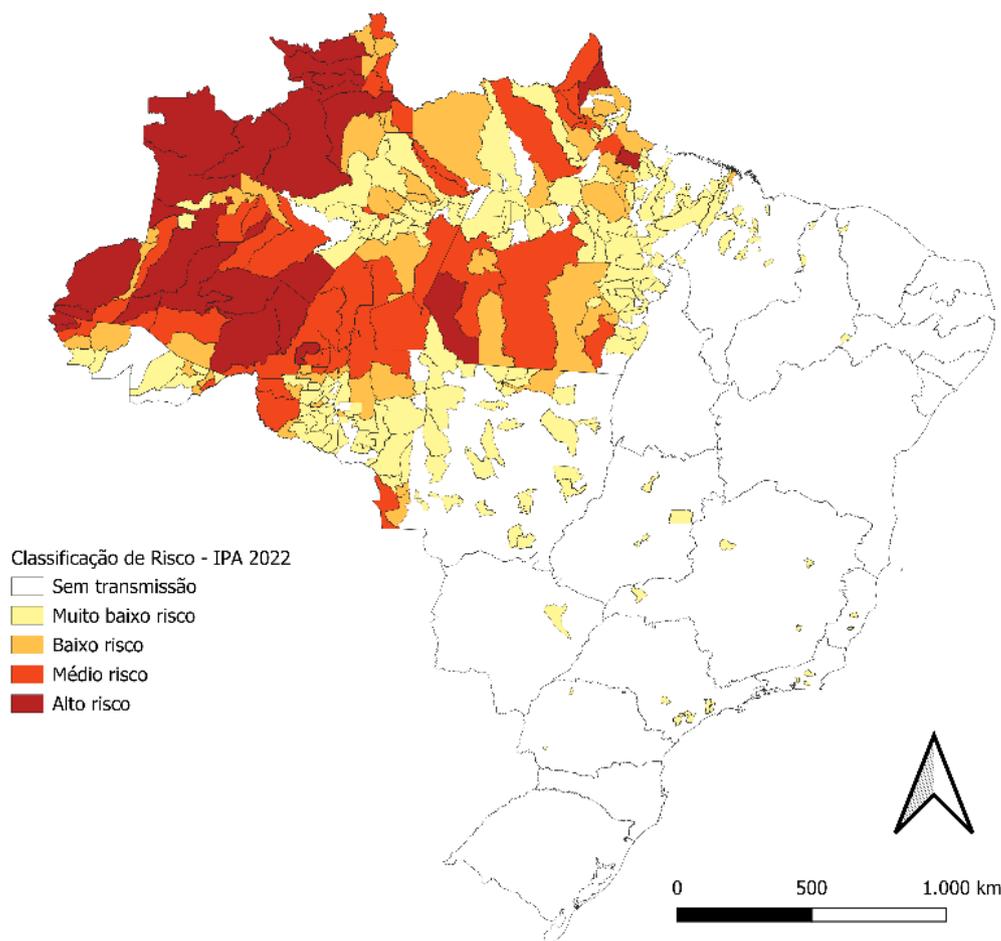
**Figura 1 – Países endêmicos para a malária e seu status no ano de 2022.** Adaptado de *World Health Organization. World Malaria Report 2023*.

Conforme os dados da OMS, em 2022, foram registrados 249 milhões de casos da doença, representando um aumento de 5 milhões de casos em comparação com 2021.

A grande maioria do número ocorreu no continente africano, que respondeu por 94% dos casos mundiais (WHO, 2023). O sudeste asiático contribuiu com 2% do total de casos globais, sendo a Índia responsável por 66% dos casos de malária nessa região. Na região das Américas, observou-se uma redução nos casos, principalmente devido ao aumento de diagnóstico eficaz associado ao tratamento rápido. No entanto, Brasil, Venezuela e Colômbia continuam responsáveis por 73% dos casos de malária nessa região (WHO, 2023).

Apesar da redução no número de mortes por malária, que passou de 631 mil em 2019 para 608 mil em 2022, a doença continua sendo letal, especialmente infecções por *P. falciparum*, a espécie mais virulenta causadora da malária humana. Esta espécie foi responsável por 96% das mortes globais em 29 países africanos, afetando principalmente crianças menores de 5 anos (WHO, 2023). Esses dados evidenciam que a malária continua sendo um sério problema de saúde pública, sobretudo na África, um continente onde a miséria, fome, desigualdade social, conflitos armados e outras enfermidades coexistem.

No Brasil, a malária é endêmica na região que abrange os estados pertencentes à Amazônia Legal, incluindo Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (**Figura 2**). Em 2023, foram notificados mais de 138 mil casos de malária nessa área, representando um aumento de cerca de 10 mil casos em relação a 2022 (SIVEP-MALARIA/SVS – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). Além disso, verificou-se que 85% dos casos de malária foram causados por *P. vivax*, ao passo que 15% foram atribuídos a infecções por *P. falciparum* (SIVEP-MALARIA/SVS – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).



Classificação da Incidência Parasitária Anual (IPA): Sem transmissão - 0 casos autóctones; Muito baixo risco - IPA <1 caso/1.000 habitantes; Baixo risco - IPA <10 casos/1.000 habitantes; Médio risco - IPA <50 casos/1.000 habitantes; Alto risco - IPA  $\geq$ 50 casos/1.000 habitantes.

Data de atualização dos dados: 11 de julho de 2023. Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVSA/MS e E-SUS-VS.

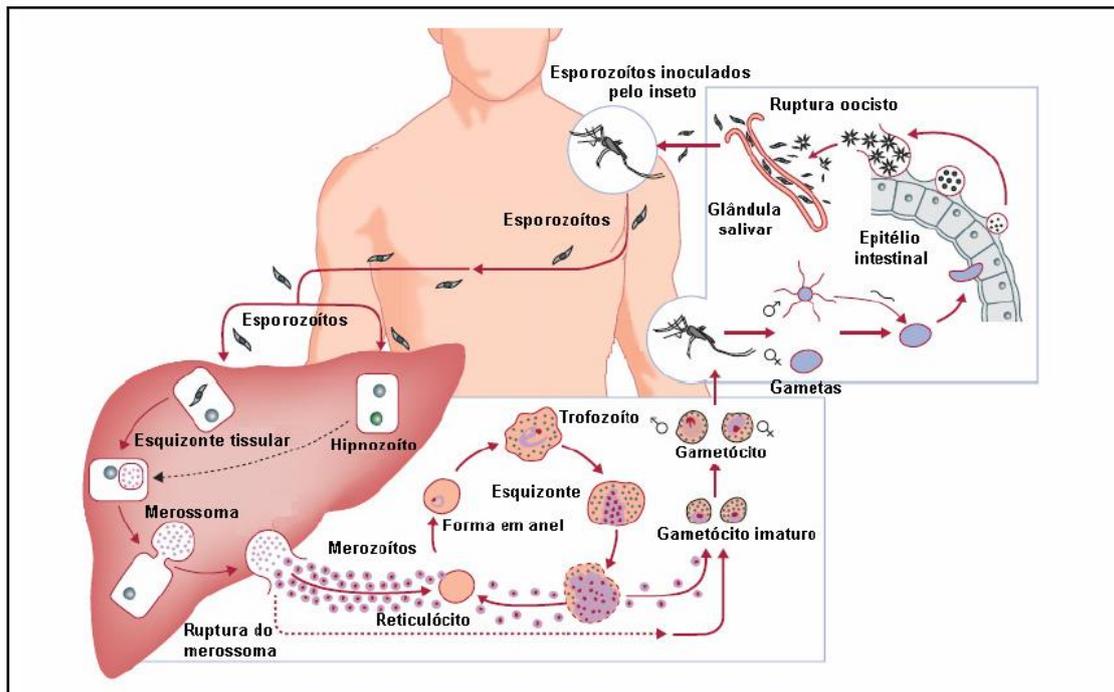
**Figura 2 – Mapa de risco de transmissão da malária, por município, no Brasil, em 2023.** O risco é estimado a partir da IPA = Incidência Parasitária Anual (número de diagnósticos positivos para malária por 1000 habitantes, em uma determinada área, no período de um ano). O risco é dividido entre baixo (IPA < 10 casos/mil habitantes), médio (IPA entre 10 a 49 casos/mil habitantes) e alto (IPA  $\geq$  50 casos/mil habitantes). Fonte: Ministério da Saúde – Sinan/SVS/MS e Sivep – Malária/SVS/MS 2023.

Apesar de a maioria dos casos de malária ocorrer na região amazônica, os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde indicam que a região extra-amazônica teve 32 casos registrados, sendo 29 de infecções por *P. vivax* e 3 por *P. falciparum*, uma redução de 72% em comparação com 2021, quando foram registrados 112 casos de malária fora da área endêmica (SIVEP-MALARIA/SVS – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). É importante ressaltar que, apesar da drástica redução no número de casos na região extra-amazônica, a letalidade da malária é significativamente maior nessa área. Isso se deve ao fato de que, fora da área endêmica, o quadro febril inespecífico é frequentemente confundido com o de outras doenças

febris, como a dengue, contribuindo para atrasos no diagnóstico e o início do tratamento, o que agrava prognóstico da infecção.

## 1.2. Ciclo biológico de *Plasmodium* spp

Os parasitos do gênero *Plasmodium* apresentam um ciclo biológico heteroxênico, composto por um hospedeiro definitivo, mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, e um hospedeiro intermediário, o homem (**Figura 3**). No hospedeiro intermediário, o ciclo tem início por meio do repasto sanguíneo de fêmeas infectadas, que inoculam as formas esporozoítas na derme do hospedeiro (MÉNARD et al., 2013). Para se deslocarem e atingirem os hepatócitos, os esporozoítos utilizam um tipo de movimentação conhecida como *gliding*, no qual a interação entre adesinas expressas na superfície do parasito com o substrato gera uma força propulsora fornecida por um motor de actina-miosina localizado entre a membrana citoplasmática e o complexo de membrana interna do parasito, denominado glideossomo (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011).



**Figura 3 – Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*.** Adaptado de Mueller et al., 2009.

No processo de migração até os hepatócitos, os esporozoítos que não alcançam os vasos sanguíneos são destruídos e drenados pelos vasos linfáticos (COWMAN et al., 2016). Aqueles esporozoítos que atingem rapidamente a corrente sanguínea conseguem alcançar o fígado, por meio de um processo denominado “travessia” (COWMAN et al., 2016; CHORA; MOTA; PRUDÊNCIO, 2022). Para invadir os hepatócitos, os esporozoítos devem atravessar a barreira sinusoidal, composta por células endoteliais e as células de Kupffer (TAVARES et al., 2013). Uma alternativa para os esporozoítos é atravessar essas células por meio da formação de vacúolos transitórios, uma estratégia independente da formação da junção móvel (RISCO-CASTILLO et al., 2015).

Ao encontrar o hepatócito, o esporozoítos inicia o processo de invasão celular, primeiro aderindo-se à membrana de célula hospedeira. O parasito estabelece, assim, uma íntima associação com a membrana da célula hospedeira e se reorienta, de modo que o complexo apical entre em contato com a membrana da célula hospedeira. Em seguida, organelas secretórias especializadas, como as micronemas e roptrias, secretam seus conteúdos (CARRUTHERS; SIBLEY, 1997). A junção móvel é formada, constituindo um complexo de proteínas que estabelece uma ligação firme entre o parasito e a membrana da célula hospedeira (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011; BARGIERI et al., 2014; HORTA et al., 2020). Com a formação da junção móvel, o parasito sofre uma constrição, deformando o seu corpo, sendo impulsionado para

dentro da célula hospedeira, formando uma invaginação que resultará no vacúolo parasitóforo, processo este que ocorre em menos de um minuto (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011; BARGIERI et al., 2014; HORTA et al., 2020).

Uma vez estabelecida a infecção no hepatócito, o esporozoíto inicia o desenvolvimento na forma conhecida como trofozoíto hepático, que, posteriormente, se transformará em um esquizonte hepático. Todo esse processo ocorre em um período de 7 a 14 dias, variando de acordo com a espécie de *Plasmodium* responsável pela infecção (MÉNARD et al., 2013; COWMAN et al., 2016; CHORA; MOTA; PRUDÊNCIO, 2022). O esquizonte hepático dará origem aos merozoítos, que serão liberados nos sinusóides hepáticos e, em seguida, alcançarão a corrente sanguínea em vesículas formadas pela membrana celular dos hepatócitos, conhecidas como merossomos (STURM et al., 2006; MÉNARD et al., 2013).

É crucial ressaltar que *P. vivax* e *P. ovale* têm a capacidade de gerar formas dormentes nos hepatócitos, conhecidas como hipnozoítos, que atuam como reservatórios de parasitos e são responsáveis pelas recaídas de infecção, mesmo após o tratamento e a completa eliminação das formas assexuadas sanguíneas (KROTOSKI, 1989; ADEKUNLE et al., 2015). Esta característica peculiar torna o controle epidemiológico mais desafiador e interfere na dinâmica da transmissão dos parasitos durante infecções provocadas por essas espécies.

Quando são liberados na corrente sanguínea, os merozoítos livres invadem os eritrócitos de maneira rápida e dinâmica, em um processo que pode ser dividido em diferentes fases: pré-invasão, invasão ativa e equinocitose (WEISS et al., 2015). É importante destacar que os merozoítos de *P. vivax* invadem exclusivamente reticulócitos (eritrócitos jovens) (KITCHEN, 1938). Durante a fase de pré-invasão, ocorre uma intensa interação entre o merozoíto e o reticulócito, resultando na deformação da célula hospedeira devido à ação do motor de actina-miosina (WEISS et al., 2015). A seguir, o parasito se liga irreversivelmente à membrana do eritrócito, e a invasão ocorre de forma semelhante à descrita para os esporozoítos.

Após a fase de invasão ativa, ocorre na porção anterior do merozoíto a fusão da membrana celular com a membrana do vacúolo parasitóforo, fazendo com que o parasito se feche completamente dentro do vacúolo (COWMAN et al., 2016). Uma vez estabelecida a infecção no eritrócito, inicia-se a esquizogonia, processo de multiplicação no qual merozoítos filhos são gerados pela segmentação do esquizonte. A esquizogonia resulta em 16 a 32 novos merozoítos, os quais romperão a membrana do eritrócito e

serão liberados na corrente sanguínea, reiniciando o ciclo eritrocítico (VAN DOOREN et al., 2005; COWMAN et al., 2016).

Para que o ciclo de vida do parasito prossiga, é essencial que haja a formação da forma sexuada, o gametócito, ainda durante o ciclo eritrocítico do parasito. Embora os eventos moleculares, nesta etapa, ainda não sejam completamente compreendidos, acredita-se que a definição do destino do merozoíto, ou seja, se ele se tornará um gametócito ou continuará o ciclo sanguíneo, ocorra durante a esquizogonia (COWMAN et al., 2016; BERI; BALAN; TATU, 2018). O aumento na produção de gametócitos parece estar relacionado a diferentes estímulos, como a elevada parasitemia e a exposição aos antimaláricos, sugerindo que o parasito pode ser capaz de “sentir” o ambiente que se encontra (COWMAN et al., 2016). Em infecções por *P. vivax*, os gametócitos aparecem rapidamente na circulação, antes mesmo do hospedeiro desenvolver as manifestações clínicas, o que complica ainda mais o controle desta espécie (MUELLER et al., 2009).

Demonstrou-se que tanto no modelo murino *in vivo* (DE NIZ et al., 2018), quanto em pacientes infectados por *P. vivax* (BARO et al., 2017; BRITO et al., 2022), que os gametócitos possuem uma preferência em se desenvolverem na medula óssea ou nos vasos sanguíneos periféricos do baço (KHO et al., 2021a, 2021b). Por essa razão, tem sido sugerido que existe uma população distinta de merozoítos “sexuais” que são capazes de extravasar para tecidos extravasculares (revisado por DUMARCHEY; LAVAZEC; VERDIER, 2022). Esses achados sugerem a existência de um ciclo assexuado extravascular que poderia representar um reservatório significativo de parasitos, com possíveis implicações para o diagnóstico e tratamento, além de influenciar a formação da resposta imunológica antiparasitária e, possivelmente, a perturbação da homeostase das células da medula, fazendo com que haja uma hiperestimulação, podendo desencadear em uma resposta autoimune.

Quando ingerido por fêmeas de mosquitos *Anopheles*, que realizaram o repasto sanguíneo em indivíduos infectados, os gametócitos se desenvolverão no inseto, iniciando assim o ciclo sexuado do parasito. No trato digestivo do inseto, após o rompimento da membrana do eritrócito, os gametócitos tornam-se sexualmente estimulados. O microgameta (macho) tem seu núcleo fragmentado em 8 pequenos núcleos e 8 corpos flagelados, processo denominado exflagelação (CARTER; NIJHOUT, 1977; PRASAD; APARNA; HARENDRA KUMAR, 2011; BERI; BALAN; TATU, 2018). Quando um destes corpos flagelados penetra o macrogameta

(fêmea), um zigoto diploide é formado e transforma-se em um oocineto. Essa forma evolutiva é capaz de penetrar o endotélio do mosquito, de maneira semelhante aos esporozoítos e merozoítos no hospedeiro vertebrado, e se instala abaixo da membrana basal do inseto onde se transforma em um oocisto, que se transforma em uma espécie de cápsula onde ocorrerão múltiplas divisões, formando milhares de esporozoítos (GALINSKI; MEYER; BARNWELL, 2013; BERI; BALAN; TATU, 2018).

Este oocisto é, então, rompido, liberando milhares de esporozoítos na hemocele do mosquito. Estas formas migram e penetram as glândulas salivares do inseto hospedeiro, onde aguardam até que o mosquito realize novo repasto sanguíneo e, conseqüentemente, injete estas formas evolutivas juntamente ao fluido salivar na derme de um novo hospedeiro (revisado por GALINSKI; MEYER; BARNWELL, 2013).

### **1.3. Patogênese da malária vivax**

Ao examinarmos o ciclo de vida dos parasitos do gênero *Plasmodium*, deparamo-nos com diversas formas evolutivas. Contudo, apenas as formas eritrocíticas conduzem à doença clínica e à maioria dos sintomas apresentados por pacientes com malária. Assim como em toda doença infecciosa, as manifestações clínicas resultam da interação parasito-hospedeiro, considerando também fatores de ambos, como a diversidade genética do parasito e do hospedeiro, coinfeções, comorbidades, tratamento ineficaz e determinantes do ambientais, tais como a idade do hospedeiro, *status* nutricional e exposição cumulativa à malária (GONÇALVES; LIMA; FERREIRA, 2014). No caso da malária, a combinação desses fatores resulta em um espectro de manifestações clínicas que incluem, principalmente, febre, calafrios, mialgia, anemia e, em casos mais graves, coma (WHITE et al., 2014; COWMAN et al., 2016).

Conforme mencionado, a malária pode ser categorizada como malária não complicada e malária grave. A malária não complicada é caracterizada pela aparição de sintomas, mas sem sinais clínicos ou laboratoriais que indiquem gravidade ou disfunção em órgãos vitais (WHO, 2023). As manifestações clínicas resultam da resposta do sistema imunológico ao desenvolvimento do parasito nos eritrócitos do hospedeiro, podendo iniciar-se a partir da ruptura do merossomo liberado pelas células hepáticas, ou tardiamente, quando o nível de parasitos circulantes ativa a resposta imune, gerando a sintomatologia clínica (MILNER, 2018). Desta forma, os eventos que desencadeiam as

manifestações clínicas na malária incluem os elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, a adesão de células infectadas às células endoteliais dos capilares sanguíneos e a remoção de células infectadas por macrófagos residentes do baço (ANTONELLI et al., 2020). As infecções por *P. vivax* são intrigantes do ponto de vista imunológico, pois a parasitemia dessa espécie é relativamente baixa devido à sua limitação em invadir apenas reticulócitos (KITCHEN, 1938). Por muito tempo, acreditou-se que a malária vivax não causasse sintomatologia grave; no entanto, esse cenário vem mudando ao longo dos últimos anos (ROGERSON; CARTER, 2008; ANDRADE et al., 2010; SINGH et al., 2011; NAING et al., 2014; RAHIMI et al., 2014; KOTEPUI et al., 2020; DUONG et al., 2023).

Sempre foi amplamente reconhecido que *P. falciparum* é a espécie responsável pela malária mais grave, enquanto *P. vivax*, embora seja a espécie mais bem distribuída globalmente, tende a causar uma forma mais leve da doença, frequentemente referida como benigna. No entanto, casos de malária grave, causados por *P. vivax*, são documentados desde 1900 (RAHIMI et al., 2014) e afetam principalmente crianças, neonatos e mulheres grávidas (RODRIGUEZ-MORALES; BENITEZ; ARRIA, 2007; TJITRA et al., 2008; POESPOPRODJO et al., 2009; NAYAK et al., 2014; DRYSDALE et al., 2023). Complicações associadas à malária grave por *P. vivax* incluem anemia (TJITRA et al., 2008; QUINTERO et al., 2011), disfunção renal (KUTE et al., 2012a, 2012b; MEHNDIRATTA; RAJESHWARI; DUBEY, 2013), edema pulmonar (PUKRITTAYAKAMEE et al., 1998; ILLAMPERUMA; ALLEN, 2007; AASHISH; MANIGANDAN, 2015), disfunção respiratória (CARLINI; WHITE; ATMAR, 1999; LOMAR et al., 2005; ATAM et al., 2013; LEE et al., 2013) e malária cerebral (KARANTH; MARUPUDI; GUPTA, 2014; MALLELA et al., 2016). Esses dados indicam a necessidade de aprimoramento dos esforços para o controle de *P. vivax*, bem como o aumento do investimento em diagnósticos preventivos, novas estratégias de tratamento e uma compreensão mais aprofundada de como essa espécie está contribuindo para casos de malária grave.

Durante muitos anos, acreditou-se que a resposta inicial às infecções por *Plasmodium* spp era atribuída à presença da “toxina malárica”, uma molécula liberada na corrente sanguínea após a ruptura do esquizonte. Atualmente, compreende-se que a “toxina malárica” consiste em padrões de reconhecimento moleculares (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Esses componentes são liberados durante a ruptura das células infectadas, desencadeando a ativação das células do

sistema imunológico inato e resultando em uma “tempestade de citocinas”. Destas, destacam-se o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 10 (IL-10), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator nuclear  $\kappa$ B (nf $\kappa$ B), contribuindo para a sintomatologia inicial no hospedeiro (KARUNAWEEERA et al., 2003; CLARK et al., 2008; MCCALL; SAUERWEIN, 2010; RANDALL; ENGWERDA, 2010; FREITAS DO ROSARIO; LANGHORNE, 2012; PUNSAWAD et al., 2012; GUN et al., 2014).

Em infecções por *P. vivax*, devido à exacerbação da resposta imune inata, observam-se elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, no plasma de pacientes sintomáticos (FERNANDES et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012; HOJO-SOUZA et al., 2017; VENTURA et al., 2018). Isso contrasta com a ausência dessa “tempestade de citocinas” e a diminuição dos níveis destas moléculas em pacientes assintomáticos infectados por *P. vivax* (GONÇALVES et al., 2012), indicando que a patogenia inicial da doença está intimamente associada à resposta do hospedeiro ao parasito. Estudos sugerem que algumas citocinas e quimiocinas, como IL-4, IL-10, CCL2 e TGF- $\beta$ , presentes nesta fase, podem servir de biomarcadores para gravidade em infecções por *P. vivax* (TOVAR ACERO et al., 2022).

A resposta imune adaptativa durante infecções por *P. vivax* é complexa e ainda pouco explorada (JANGPATARAPONGSA et al., 2006, 2012; LIMA-JUNIOR et al., 2008, 2010). A associação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa é dificultada pelo curto tempo de proteção gerado pela resposta contra *P. vivax*; no entanto, a ativação das células do sistema imune inato e as respostas pró-inflamatórias são importantes para a ativação de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células B (ANTONELLI et al., 2020).

A resposta de células B, mediante diferenciação e ativação em células B de memória e plasmócitos, com a produção de anticorpos, desempenha um papel crucial na imunidade adquirida após exposição à malária. A resposta de anticorpos a diversos antígenos de *P. vivax* e suas associações com proteção, exposição e comorbidades têm sido estudadas ao longo do tempo (BRAGA; FONTES; KRETTLI, 1998; BUENO et al., 2008; MOURÃO et al., 2012; CASSIANO et al., 2016; SOARES et al., 2019). No entanto, não há consenso sobre a longevidade desta resposta durante a malária. Em infecções por *P. vivax*, há controvérsias sobre o aumento ou não da população total destas células (FIGUEIREDO et al., 2017; MIN et al., 2017; SOARES et al., 2019), embora seja sabido que há um aumento de células B de memória atípicas que podem

estar associadas com a autoimunidade (RIVERA-CORREA et al., 2019b, 2020; SOARES et al., 2019). A associação entre células B, anticorpos e autoimunidade será explorada mais detalhadamente posteriormente neste texto.

A falta de um modelo *in vitro* que permita estudos com *P. vivax* fora da área endêmica representa um desafio para as investigações das interações parasito-hospedeiro, resultando em lacunas significativas no entendimento da resposta imunológica desencadeada por infecções por esta espécie. Assim, é imperativo conduzir estudos mais aprofundados para compreender, em nível molecular e celular, essas interações, especialmente no que diz respeito à resposta imune adaptativa.

## 2. JUSTIFICATIVA

Dentre as espécies de *Plasmodium* que afetam seres humanos, *P. vivax* é a mais amplamente distribuída globalmente e é o principal agente causador da malária no Brasil, associada principalmente à ocorrência de anemia como das principais complicações decorrentes da infecção. A anemia relacionada à malária vivax é de natureza multifatorial, e diversos mecanismos têm sido propostos na tentativa de elucidar sua etiologia. A participação de autoanticorpos direcionados a componentes de eritrócitos tem sido extensivamente discutida em publicações provenientes do nosso grupo de pesquisa. De fato, nossa hipótese é a de que a autoimunidade pode desempenhar um papel determinante na destruição de eritrócitos não infectados, desencadeando um quadro anêmico em pacientes infectados por *P. vivax*. De fato, alguns antígenos como a *band 3* e a PS já foram discriminados como alvos de autoanticorpos durante infecções por *P. vivax*. No entanto, ainda não foi elucidado o papel dos anticorpos dirigidos a estes antígenos, bem como a identificação simultânea e suas correlações durante a malária vivax.

A formação de neoantígenos, ou seja, o reconhecimento de epítomos que não são naturalmente reconhecidos, e a resposta autoimune associada à proteína *band 3* pode ter papel relevante no desencadeamento de mecanismos imunológicos durante a anemia em infecções por *P. vivax*. A proteína *band 3* é um componente essencial da membrana de eritrócitos e está implicada em funções críticas, incluindo o transporte de íons e a manutenção da integridade celular. A emergência de neoantígenos nessa proteína, seja por modificações pós-traducionais, interações com patógenos ou outros processos biológicos, pode desencadear respostas autoimunes, levando a condições como a anemia e outras manifestações relacionadas. Dessa forma, este estudo visa contribuir para avanços teóricos significativos acerca da resposta autoimune em infecções por *P. vivax*. A compreensão das funções imunológicas dos autoanticorpos direcionados a estes antígenos têm o potencial de aprimorar nossa compreensão sobre mecanismos subjacentes à patogênese da anemia. Esses resultados podem orientar futuras investigações científicas, impulsionando o desenvolvimento de testes prognósticos de morbidade, especialmente para a anemia autoimune durante a malária vivax.

### 3. CAPÍTULO 1: AUTOANTÍGENOS E SUAS RELAÇÕES COM A ANEMIA E INFECÇÕES POR *P. VIVAX*

#### 3.1 Autoimunidade em infecções por *Plasmodium spp*

Infecções por *Plasmodium spp* promovem elevados níveis de anticorpos circulantes com uma ampla gama de especificidades. Estes anticorpos são cruciais para o controle da doença (TEO et al., 2016), contudo, podem surgir anticorpos capazes de reconhecer moléculas próprias do hospedeiro (LUDWIG et al., 2017). A presença destes autoanticorpos também têm sido extensivamente reportada em pacientes com malária (ROSENBERG et al., 1973; BERZINS; WAHLGREN; PERLMANN, 1983; DANIEL-RIBEIRO et al., 1983; WOZENCRAFT et al., 1990; FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016; MOURÃO et al., 2016; RIVERA-CORREA et al., 2017; MOURÃO et al., 2018; BARBER et al., 2019; RIVERA-CORREA et al., 2019a, 2019b; MOURÃO et al., 2020; RIVERA-CORREA et al., 2020).

Uma das diversas maneiras pelas quais infecções podem induzir autoimunidade é através do mimetismo molecular, que ocorre quando patógenos compartilham epítomos de moléculas do hospedeiro, levando à ativação de células B e T autorreativas (KAPLAN; MEYESERIAN, 1962; ROJAS et al., 2018). Uma questão intrigante que surge ao investigar o mimetismo molecular associado à autoimunidade é a de por que não desenvolvemos doenças autoimunes mesmo quando estamos constantemente expostos a patógenos? Para explicar este fenômeno, vários estudos buscam destacar as células B como as principais responsáveis pela autoimunidade, ao produzirem anticorpos contra antígenos próprios (RIVERA-CORREA et al., 2017, 2019a). No entanto, em algumas infecções que resultam em autoimunidade, a produção de autoanticorpos é ausente (NOTTURNO et al., 2009), sugerindo que não apenas as células B, mas também as células T autorreativas possam estar envolvidas nesse processo (revisado por (CUSICK; LIBBEY; FUJINAMI, 2012). Assim como outros processos, o mimetismo molecular deve ser considerado não apenas como um simples compartilhamento de epítomos entre patógeno e hospedeiro, mas como um fenômeno que envolve fatores genéticos e ambientais, como a alimentação e o estilo de vida do hospedeiro, favorecendo o surgimento da autoimunidade durante uma infecção (revisado por ROJAS et al., 2018).

Em infecções por *Plasmodium* spp, já foram descritos exemplos de mimetismo molecular, como a proteína PftCTP de *P. falciparum* (*P. falciparum translationally controlled tumor protein*) e o fator de liberação de histamina (HRF) de humanos (MACDONALD et al., 2001), assim como a proteína de membrana I de *P. falciparum* (PfEMP1) (LUDIN; NILSSON; MÄSER, 2011). No contexto de infecções por *P. vivax*, análises *in silico* revelaram a presença de 23 proteínas semelhantes a proteínas de eritrócitos humanos, como anquirina, actina e espectrina (MOURÃO et al., 2018). Embora haja estudos indicando que espécies de *Plasmodium* spp têm a capacidade de mimetizar proteínas do hospedeiro, poucos associam diretamente o mimetismo molecular à autoimunidade (GREENWOOD, 1974; MOURÃO et al., 2018). Nossas pesquisas demonstraram que pacientes anêmicos, infectados por *P. vivax* apresentam maior quantidade anticorpos contra a espectrina, sugerindo que o mimetismo molecular pode desencadear respostas autorreativas durante a malária (MOURÃO et al., 2018). Contudo, permanece a controversa contribuição desses anticorpos anti-espectrina para a anemia, uma vez que esta é uma proteína do citoesqueleto de eritrócitos.

Outro mecanismo que busca explicar o surgimento de uma resposta autoimune é a ativação *bystander*, caracterizada como um fenômeno independente de antígenos, no qual células parasitadas induzem células não infectadas a produzirem mediadores inflamatórios (co-sinalisadores, citocinas, quimiocinas e vesículas extracelulares) (HOLMGREN; MCCONKEY; SHIN, 2017; PACHECO et al., 2019). A principal característica dessa resposta imunológica é a ativação de células B e T sem o envolvimento dos seus respectivos receptores (BCR e TCR) (TOUGH; BORROW; SPRENT, 1996). Essa ativação “não clássica” de células B e T pode ocorrer tanto por contato direto do parasito ou célula parasitada com as células imunológicas, quanto por sinais enviados a distância, por microvesículas, por exemplo (HOLMGREN et al., 2017). Evidências deste fenômeno na malária já foram descritas (HANSEN et al., 2003; TIBA et al., 2011; MANTEL et al., 2013).

Adultos infectados por *P. falciparum* apresentam mais células T CD4<sup>+</sup> ativadas do que indivíduos sem histórico de contato com o parasito. Essa intensa produção de células T CD4<sup>+</sup> é estimulada pela elevada concentração de IFN- $\gamma$  durante a fase primária da infecção (TIBA et al., 2011). Outro estudo demonstrou que células NK (*Natural Killer*) podem induzir respostas contra *P. berghei*, produzidas por células B, inclusive estimulando essas células a produzirem anticorpos contra proteínas ancoradas por GPI (Glicosilfosfatidilinositol) (HANSEN et al., 2003). Mantel e colaboradores

(2013) observaram que microvesículas de eritrócitos parasitados por *P. falciparum* eram capazes de estimular células mononucleares de sangue periférico (PBMCs – *peripheral blood mononuclear cells*) humanas, potencialmente imunomodulando a resposta do hospedeiro ao parasito, o que pode desempenhar um papel crucial na patologia da doença.

Seguindo essa linha, nosso grupo de pesquisa demonstrou que eritrócitos não infectados, quando opsonizados por anticorpos comerciais anti-eritrócitos, poderiam induzir a produção de microvesículas por estas células (MOURÃO et al., 2016). Dessa forma, a produção destas partículas poderia estar associada à ativação *bystander* de células B e T, através do transporte de antígenos próprio dentro destas partículas, resultando na ativação autorreativa das células. No entanto, essa hipótese demanda mais estudos e evidências.

Além disso, está amplamente estabelecido que, durante as respostas imunes iniciais, epítomos de antígenos são reconhecidos e adquiridos pelo sistema imune. Todavia, ao longo de uma infecção, epítomos não dominantes podem também se tornar imunogênicos e serem alvos de células B e T. Essa reatividade a novos epítomos endógenos é denominada “espalhamento de epítomos”, caracterizando-se pelo surgimento de uma resposta imune contra epítomos secundários endógenos e pela liberação de antígenos próprios durante uma condição autoimune ou resposta inflamatória (VANDERLUGT; MILLER, 1996). Esse fenômeno leva a uma diversificação do repertório de células B e T autorreativas, o que tem implicações para a patogênese das doenças associadas a essas células (LEHMANN et al., 1992; VANDERLUGT; MILLER, 2002).

Embora o espalhamento de epítomos seja mais comumente relatado em doenças autoimunes, esse fenômeno também pode ocorrer em infecções por diversos agentes patológicos (VANDERLUGT; MILLER, 2002; MÜNZ et al., 2009). Em um estudo realizado com adultos naturalmente expostos à malária no Quênia, foi observado que a resposta imunodominante contra a proteína adesiva relacionada à trombospondina de *P. falciparum* (*PfTRAP*), após a primeira exposição ao patógeno, começou a abranger epítomos menos dominantes após sucessivas e prolongadas exposições ao parasito (FLANAGAN et al., 2006).

O último mecanismo que tenta explicar o início de uma resposta autoimune é a ativação policlonal de células B e T. Este fenômeno representa uma ativação não específica dessas células em resposta a mitógenos e superantígenos produzidos pelos

parasitos como uma estratégia para escapar da resposta imune do hospedeiro e garantir sua sobrevivência (MINOPRIO, 2001; MONTES et al., 2007). Essa ativação é crucial durante a infecção, pois desencadeia uma série de reações que levam à esplenomegalia, adenopatia, imunossupressão, síndromes de choque tóxico, formação de granulomas e também autoimunidade progressiva (MINOPRIO, 2001).

Em malária, a ativação policlonal de células B e T foi reportada em vários estudos (FREEMAN; PARISH, 1978; ROSENBERG, 1978; DANIEL-RIBEIRO et al., 1983; HOGH et al., 1994; DONATI et al., 2004; RIVERA-CORREA et al., 2017). Em modelo murino, Freeman e Parish (1978) demonstraram que o sobrenadante extraído de uma solução contendo células parasitadas por *P. berghei* foi capaz de induzir a ativação policlonal de células B *in vivo*, resultando na secreção de anticorpos IgM não específicos. Também utilizando modelo com camundongos, Rosenberg (1978) observou a ativação de células T *helper* em resposta à infecção, estimulando assim células B a reconhecerem antígenos inespecíficos. Em uma coorte de pacientes infectados por *P. falciparum*, foi observado que 72% desses indivíduos possuíam autoanticorpos antinucleares, mas não contra outros antígenos (DANIEL-RIBEIRO et al., 1983). Esse fenômeno levou os autores a propor a hipótese de que ativação policlonal de células B, através de estímulo de células T, poderia estar envolvida com o surgimento desses autoanticorpos (DANIEL-RIBERIO et al., 1983). Também foi demonstrado que, em infecções por *P. falciparum*, a ativação policlonal de células T  $\gamma\delta$  pode contribuir para a proliferação de células B (HOGH et al., 1994). Vale ressaltar que proteínas, como a PfEMP-1, são capazes de promover a proliferação *in vitro* de células B, aumentando seu tamanho, a expressão de imunoglobulinas não específicas e a produção citocinas (DONATI et al., 2004). Além disso, existem evidências de uma subpopulação de células B atípicas que secretam autoanticorpos em modelo murino (RIVERA-CORREA et al., 2017), em infecções por *P. falciparum* (RIVERA-CORREA et al., 2019a) e em infecções por *P. vivax* (RIVERA-CORREA et al., 2020), sugerindo uma possível ativação policlonal. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados, pois a estimativa da real contribuição dessas subpopulações de células T e B ativadas policlonalmente é desafiadora devido à perda de marcadores fenotípicos únicos após a ativação (MONTES et al., 2007).

Autoanticorpos com várias especificidades foram identificados e associados à anemia em infecções por *Plasmodium* spp. Neste contexto, os anticorpos anti-fosfatidilserina (PS) foram identificados em pacientes com infecções por *P. falciparum*

(FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016; RIVERA-CORREA et al., 2017, 2019a, 2019b; BARBER et al., 2019), *P. vivax* (BARBER et al., 2019; RIVERA-CORREA et al., 2020), *P. malariae* (BARBER et al., 2019) e em modelo murino (FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016; RIVERA-CORREA et al., 2017). A PS é um fosfolípídeo de membrana que geralmente não está presente na superfície celular, mas pode ser exposta células apoptóticas (NAGATA, 2018). A exposição de PS em eritrócitos já foi observada em camundongos (TOTINO et al., 2010; FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016) e em pacientes humanos com malária (FENDEL et al., 2010), embora os mecanismos que levam a essa exposição ainda não sejam conhecidos.

No entanto, os anticorpos anti-PS não são encontrados em plasma de indivíduos saudáveis e são considerados patogênicos, aparecendo durante infecções e doenças autoimunes (ELKON; SILVERMAN, 2012). Correlações negativas entre os níveis destes anticorpos e os níveis de hemoglobina foram observadas tanto em pacientes infectados por *P. falciparum* como em pacientes infectados por *P. vivax* (BARBER et al., 2019; RIVERA-CORREA et al., 2019a, 2019b, 2020). É importante ressaltar que os níveis desses anticorpos anti-PS são significativamente mais elevados em infecções por *P. vivax* do que por *P. falciparum* e que estão relacionados ao processo inicial da anemia em infecções por ambas as espécies (BARBER et al., 2019).

Os anticorpos anti-PS demonstraram capacidade de se ligar tanto aos eritrócitos saudáveis quanto aos infectados, aumentando a taxa de fagocitose das células não infectadas tanto em modelo *in vitro* como *in vivo* (FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016). No entanto, esses anticorpos não conseguem aumentar as taxas de fagocitose de células infectadas, possivelmente devido à alta eficiência das células imunológicas em reconhecer esses eritrócitos infectados, graças aos antígenos parasitários expostos e às alterações na membrana provocados pelo patógeno. Isso sugere que esses anticorpos podem não ter um efeito anti-parasitário durante a infecção (FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016). Além disso, os níveis destes anticorpos durante a infecção, com outros autoanticorpos, como anti-DNA, estão associados a sucessivas hospitalizações, especialmente em crianças (RIVERA-CORREA et al., 2019b).

Devido à ativação policlonal de células B, durante a malária, células atípicas podem emergir. Rivera-Correa e colaboradores (2017) descreveram, em modelo murino, que esses anticorpos anti-PS são produzidos por uma população atípica de células B, caracterizadas pela expressão de CD11c e T-bet. A ativação dessas células depende do DNA parasitário, reconhecido por receptores do tipo *toll* 9 (TLR9), o que promove a

transcrição do fator T-bet e a secreção de autoanticorpos, em sinergia com o BCR e receptores de IFN- $\gamma$  (RIVERA-CORREA et al., 2017). O papel destas células B de memória atípicas em humanos foi mais claramente evidenciado em um estudo realizado com pacientes primo-infectados por *P. falciparum* (RIVERA-CORREA et al., 2019a). Nesse estudo, verificou-se que células B FcRL5<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> estão expandidas e associadas à secreção de anticorpos anti-PS durante a fase aguda da malária. Resultados semelhantes foram observados em infecções por *P. vivax*, em que essa subpopulação de células B de memória atípica parece ser responsável pela produção de anticorpos anti-PS e está associada à anemia (RIVERA-CORREA et al., 2020).

Embora a grande maioria dos estudos sobre autoanticorpos seja conduzida utilizando *P. falciparum* como modelo, alguns trabalhos, incluindo pesquisas por nosso grupo, já evidenciaram a presença desses autoanticorpos direcionados a moléculas de eritrócitos em infecções por *P. vivax* (MOURÃO et al., 2016, 2018, 2020; VENTURA et al., 2018; BARBER et al., 2019; RIVERA-CORREA et al., 2020). Um exemplo é a proteína *band 3*, que atua como um canal iônico que faz a troca de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) por cloreto (Cl<sup>-</sup>) (CORDAT; REITHMEIER, 2014). Nosso grupo demonstrou que essa proteína é o principal alvo de imunoglobulinas autorreativas em pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* (MOURÃO et al., 2018).

Durante as respostas imunológicas iniciais aos parasitos da malária, a *band 3* sofre modificações conformacionais moleculares, resultando na exposição de novos epítomos (PANTALEO et al., 2008; DEROOST et al., 2016). Essas alterações conformacionais, associadas à deposição de hemicromo e à geração de espécies reativas de oxigênio, podem persistir mesmo após a eliminação do parasito da corrente sanguínea, impactando a troca de íons (DEROOST et al., 2016) e afetando a função dos eritrócitos, contribuindo para anemia.

É relevante mencionar que a *band 3* eritrocítica humana possui regiões não glicosiladas cruciais para a interação com proteínas de *P. falciparum* durante o processo de invasão celular (HOGH et al., 1994; GOEL et al., 2003). *P. vivax* também utiliza dessa proteína no processo de invasão celular, por meio da interação com antígenos ricos em triptofano (*PvTRAg*s) (ALAM et al., 2016, 2015). A complexidade da interação parasito-hospedeiro pode gerar uma dificuldade para o sistema imunológico distinguir entre o próprio e o não-próprio. Nesse contexto, algumas partes da proteína podem ser apresentadas como antígenos para as células T e, posteriormente, para as células B, gerando autoanticorpos que podem contribuir para a destruição de eritrócitos

não infectados durante infecções por *P. vivax*. No entanto, é necessário realizar mais estudos para compreender como esses anticorpos são produzidos e qual é a sua real função na contribuição para a anemia na malária vivax. Aspectos estruturais e funcionais proteína *band 3*, bem como a interação dela com *P. vivax* durante a infecção serão melhor explorados no capítulo 2.

### 3.1.1. Anemia em infecções por *Plasmodium vivax*

Parasitas do gênero *Plasmodium* passam uma parte significativa de suas vidas no meio intracelular, principalmente no interior de eritrócitos, no qual são rompidos pelo desenvolvimento do parasito e isso leva às manifestações clínicas da malária. A anemia representa uma das principais complicações associadas à malária, resultando em significativa morbidade e mortalidade, especialmente entre gestantes e crianças menores de cinco anos (LAMIKANRA et al., 2007; RODRIGUEZ-MORALES; BENITEZ; ARRIA, 2007; TJITRA et al., 2008; POESPOPRODJO et al., 2009; NAING et al., 2014; WHITE, 2018). Apesar de sua relevância marcante em termos de saúde pública, a anemia relacionada à malária tem recebido, em comparação a outras áreas de pesquisa, uma atenção relativamente limitada da comunidade científica, como observado nas investigações sobre a resposta imunológica, desenvolvimento de vacinas e genômica (CHANG; STEVENSON, 2004; LAMIKANRA et al., 2007).

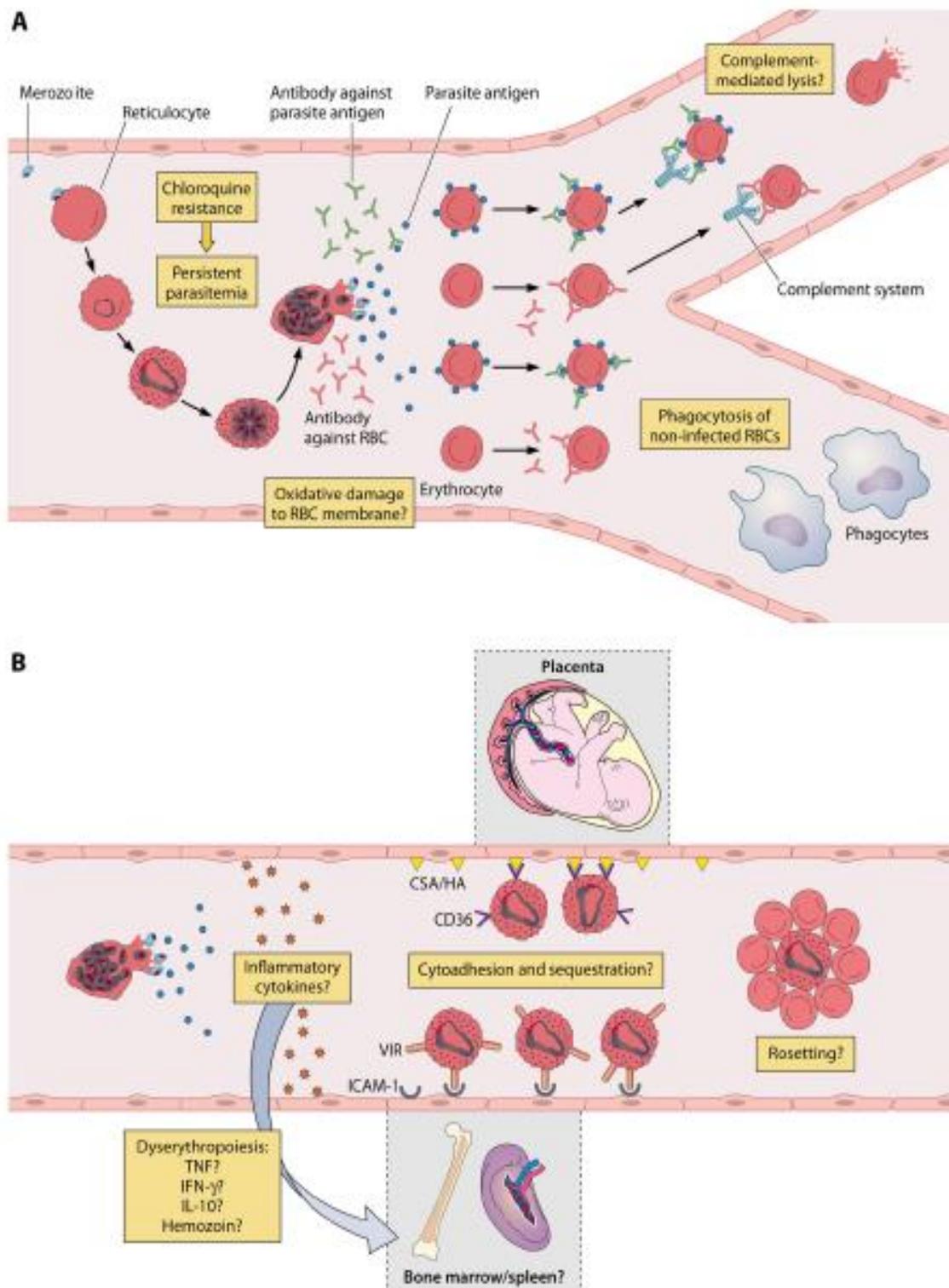
Decorrente do ciclo eritrocítico nos hospedeiros vertebrados, uma série de alterações bioquímicas, estruturais e funcionais ocorre nos eritrócitos, culminando na sua ruptura (GLUSHAKOVA et al., 2005; MILLHOLLAND et al., 2011). Isso resulta na liberação de metabólitos, outras moléculas do parasito e estruturas internas dos eritrócitos, na corrente sanguínea, desencadeando uma resposta no hospedeiro. Entretanto, é importante ressaltar que a anemia associada à malária não pode ser completamente atribuída apenas à digestão da hemoglobina e à destruição dos eritrócitos infectados (PERKINS et al., 2011; WHITE, 2018).

Nas infecções por *P. vivax*, a falta de correlação entre anemia e parasitemia torna-se mais evidente. Os reticulócitos, que compõem aproximadamente 1% das células circulantes no sangue (KITCHEN, 1938), não justificam, por si só, a anemia devido ao ciclo natural do parasito, uma vez que essas células são prontamente repostas por meio da eritropoiese (QUINTERO et al., 2011). Entretanto, é sabido que a

destruição de eritrócitos não infectados e os baixos níveis de hemoglobina podem persistir após a infecção, mesmo na ausência de parasitos circulantes (LOOAREESUWAN et al., 1987; COLLINS et al., 2003; DOUGLAS et al., 2012).

Embora se espere que, em infecções por *P. vivax*, a parasitemia seja inferior à observada em infecções por *P. falciparum*, o número absoluto de eritrócitos removidos da circulação e o grau de anemia resultante da infecção por ambas as espécies não são semelhantes (DOUGLAS et al., 2012). Utilizando modelos matemáticos com dados hematológicos e de parasitemia, estimou-se que infecções por *P. vivax* resultem na destruição de, aproximadamente, 34 eritrócitos não infectados para cada reticulócito infectado (COLLINS et al., 2003), enquanto que, em infecções por *P. falciparum*, essa proporção é de oito eritrócitos não infectados para cada eritrócito infectado (JAKEMAN et al., 1999).

Para explicar a gênese da anemia associada à malária, tem-se estudado componentes autoimunes, buscando uma compreensão mais aprofundada dos diferentes mecanismos fisiopatológicos que podem estar envolvidos na destruição de eritrócitos saudáveis (**Figura 4**). Dentre os elementos que podem contribuir para a patogênese da anemia na malária, estão a disfunção da medula óssea, que pode levar à deseritropoiese (WICKRAMASINGHE et al., 1989), e o estresse oxidativo, disparado por metabólitos do parasito ou da resposta imune à infecção que pode levar à hemólise (BILGIN et al., 2012; EREL et al., 1997). É possível, ainda, que anticorpos direcionados à antígenos do parasito aderidos aos eritrócitos não infectados, bem como a deposição de imunocomplexos, na superfície dessas células, estimulem a fagocitose por macrófagos do baço (WOODRUFF; ANSDELL; PETTITT, 1979).



**Figura 4 – Possíveis mecanismos imunológicos envolvidos no surgimento da anemia em infecções *P. vivax*.** A) Durante o ciclo eritrocítico, *P. vivax* promove a ruptura dos reticulócitos, expondo antígenos parasitários e celulares na corrente sanguínea. A resposta a estas moléculas induz elevada resposta imune do hospedeiro podendo levar a danos na membrana de eritrócitos, levando essas células à hemólise ou a serem fagocitadas. B) Imunomediadores podem atuar na medula óssea ou no baço, causando efeitos tóxicos nas linhagens eritróides levando à deseritropoiese. As células infectadas por *P. vivax* podem citoaderir em células endoteliais ou em outros eritrócitos, contribuindo para a perda de eritrócitos. Fonte: CASTRO-GOMES et al., 2014.

Durante a infecção provocada por parasitos do gênero *Plasmodium*, são gerados altos níveis de anticorpos que abrangem diversas moléculas, com uma ampla especificidade (TEO et al., 2016; RIVERA-CORREA; RODRIGUEZ, 2018; MOURÃO; CARDOSO-OLIVEIRA; BRAGA, 2020). Esses anticorpos normalmente reconhecem antígenos específicos do parasito e podem agir bloqueando a invasão do parasito em novas células, dificultando a adesão de células infectadas aos tecidos do hospedeiro ou auxiliando as células do sistema imune no combate à infecção (revisado por TEO et al., 2016). No entanto, em alguns casos, esses anticorpos gerados durante a malária podem reconhecer componentes próprios do hospedeiro e desencadear respostas autoimunes.

Anticorpos que reconhecem moléculas de eritrócitos têm sido descritos em infecções por *Plasmodium* spp desde a década de 70 (ROSENBERG et al., 1973; FACER, 1980; BERZINS; WAHLGREN; PERLMANN, 1983; FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016; MOURÃO et al., 2016, 2018; RIVERA-CORREA et al., 2019a, 2019b, 2020). No entanto, o papel destes anticorpos, como contribuintes para a anemia malárica, ainda não foi completamente explorado.

Os mecanismos que desencadeiam a produção de autoimunidade na malária ainda são pouco conhecidos. Compreender como ocorre esse fenômeno, identificar os fatores iniciadores e entender os papéis desempenhados pelas diversas moléculas envolvidas durante a patogenia é crucial para uma melhor compreensão da dinâmica parasito-hospedeiro. Nos últimos dez anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo dos autoanticorpos relacionados à patogênese da anemia em infecções por *P. vivax* (MOURÃO; CARDOSO-OLIVEIRA; BRAGA, 2020).

## 3.2. OBJETIVOS

### 3.2.1. Objetivo geral:

Avaliar a resposta de autoanticorpos contra diferentes autoantígenos em pacientes infectados por *P. vivax* e associação deste fenômeno com a anemia malárica.

### 3.2.2. Objetivos específicos:

- Revisar a literatura com o objetivo de identificar e discutir os possíveis mecanismos responsáveis pela produção de autoanticorpos durante infecções causadas por *Plasmodium* spp, bem como descrever quais são os alvos destes autoanticorpos;
- Avaliar a diferença na resposta de autoanticorpos anti-eritrócitos, anti-*band 3*, anti-PS e anti-DNA entre pacientes anêmicos e não anêmicos com infecção patente por *P. vivax*;
- Analisar a intensidade de ligação de anticorpos purificados do plasma de pacientes infectados por *P. vivax* a eritrócitos não infectados (de indivíduos saudáveis e infectados por *P. vivax*) e quais são suas especificidades;
- Estabelecer uma correlação entre os níveis de autoanticorpos dirigidos a diferentes antígenos e os parâmetros hematológicos e parasitológicos apresentados pelos pacientes infectados por *P. vivax*.

### **3.3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.3.1. Revisão integrativa**

Esta pesquisa utilizou como metodologia a revisão integrativa da literatura. De acordo com Mendes, Silveira e Galvão (2008), esse tipo de revisão tem como objetivo sintetizar os resultados de pesquisas sobre um determinado tema, contribuindo para seu profundo conhecimento. A revisão integrativa é constituída de seis etapas; elaboração da pergunta norteadora; busca de amostragem na literatura; coleta de dados; análise crítica dos estudos incluídos; discussão dos resultados; apresentação da revisão integrativa (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010).

#### **3.3.2. Critérios de busca**

Realizaram-se buscas bibliográficas de publicações referentes à autoanticorpos e malária. A população deste estudo foi composta por artigos científicos dos bancos de dados PubMed®. Foram utilizadas palavras chaves como “*autoantibodies*”, “*Plasmodium falciparum*”, “*Plasmodium vivax*”, “*autoimmune response*”, “*bystander*”, “*epitope spreading*”, “*B cell polyclonal activation*”, “*molecular mimicry*”. Os artigos utilizados são de livre acesso e escritos em inglês.

#### **3.3.3. Área e população de estudo**

Nesta etapa do estudo, foram utilizados plasmas de indivíduos com infecção patente por *Plasmodium vivax* (n = 83) que procuraram atendimento médico nas unidades de saúde Hospital Universitário Júlio Muller, em Cuiabá, Mato Grosso (n = 49) e na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus, Amazonas (n = 34). Esses indivíduos foram avaliados no dia do diagnóstico positivo para malária. Coletaram-se os plasmas no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2006 a janeiro de 2017, através de punção venosa, em tubos Vacutainer®, contendo anticoagulante (EDTA ou heparina), e encontram-se estocados a -20°C na soroteca do Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Realizou-se o diagnóstico dos pacientes com suspeita clínica de malária por meio do exame microscópico de gota espessa e confirmado por amplificação do gene 18s SSU rRNA de *Plasmodium* (SCOPEL et al., 2004). A parasitemia (parasitos/ $\mu$ L de sangue) foi determinada a partir da contagem de 100 campos microscópicos, utilizando-se aumento de 10x na lente ocular e 100x na lente objetiva, sob imersão em óleo. Os pacientes infectados por *P. vivax* foram distribuídos em dois grupos de acordo com a concentração de hemoglobina detectada no hemograma: i) infectados não anêmicos, aqueles cuja concentração de hemoglobina era superior a 11 g/dL (n = 58), e ii) infectados anêmicos, aqueles cuja concentração de hemoglobina foi igual ou inferior a 11 g/dL (n = 25), como descrito em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (MOURÃO et al., 2016, 2018, 2020). É importante ressaltar que apenas os pacientes com anemia normocítica (volume corpuscular médio igual a 80-95 dL) e normocrômica (concentração de hemoglobina corpuscular média de 32-36 g/dL) foram incluídos neste estudo.

Todos os pacientes foram examinados por um médico especialista que, durante a consulta, aplicou um questionário padrão, previamente testado e elaborado, contendo perguntas a dados pessoais, à quantidade prévia de episódios de malária e histórico clínico e ao perfil demográfico e socioeconômico dos indivíduos. Valores clínicos, demográficos e parasitológicos estão demonstrados na **Tabela 1**. Os indivíduos diagnosticados com malária foram tratados conforme é preconizado pelo Manual de Terapêutica da Malária, seguindo as recomendações sugeridas pelo Ministério da Saúde do Brasil. Excluíram-se, deste estudo, os pacientes que apresentaram grave desnutrição ou infecção como HIV ou hepatite.

Como controle, foram utilizados plasmas de indivíduos sem qualquer exposição prévia à malária e que residem em área não-endêmica (n = 26), em Belo Horizonte, Minas Gerais. Incluíram-se, neste estudo, apenas os indivíduos que assinaram o termo de consentimento, conforme normatiza o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, CCAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481).

### 3.3.4. Ensaios imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA)

#### 3.3.4.1. Preparo e diluição dos antígenos

A sensibilização das placas de 96 poços (Immunolon® Microtiter™ ELISA plates, Thermo Scientific) foi realizada com 50 µL de cada antígeno testado neste trabalho. As placas foram incubadas a 4°C por, aproximadamente, 16 horas. Para os antígenos comerciais ou purificados, fez-se apenas uma diluição simples para a concentração de uso: i) Proteína *band 3* na concentração 0,1 ng/µL diluída em tampão fosfato-salina (PBS) (MOURÃO et al., 2018); ii) Fosfatidilserina (PS) (Sigma-Aldrich P7769) na concentração de 20 µg/mL em etanol 100% (RIVERA-CORREA et al., 2019); iii) DNA de timo de bezerro (Sigma-Aldrich D4522) na concentração de 10 µg/mL em PBS (RIVERA-CORREA et al., 2019); iv) Proteína recombinante PvMSP-1<sub>19</sub> (fragmento de 19kDa da proteína 1 da superfície de merozoíto de *P. vivax*) na concentração de 1,0 µg/mL em PBS (LIMA et al., 2022), gentilmente cedido pela Prof.<sup>a</sup> Irene da Silva Soares, da Universidade de São Paulo.

Para os ensaios com eritrócitos inteiros utilizou-se sangue O<sup>+</sup> de doadores saudáveis nunca antes expostos a infecções por *Plasmodium* spp. O sangue foi coletado através de punção venosa em tubos Vacutainer® contendo heparina. Primeiramente fez-se a separação do plasma através de centrifugação a 1700 g aceleração 4 e freio 1 por 5 min. a temperatura ambiente. O plasma foi retirado e os eritrócitos foram diluídos 1:2 em solução salina. O sangue foi então transferido para um tubo contendo Ficoll-PaquePlus (Sigma-Aldrich). A proporção utilizada foi 4:3, ou seja, a cada 3 mL de Ficoll, foi adicionado 4 mL de sangue. Os tubos foram novamente centrifugados a 1700g aceleração 0 e freio 0 por 20 min. à temperatura ambiente. Após esta etapa, todo o sobrenadante e um pouco da papa de eritrócitos foram retirados para evitar a contaminação da amostra por células brancas, e lavados por duas vezes com solução salina a 1700 g por 5 min. cada. Após as lavagens, os 1 µL da papa de eritrócitos foi diluído em 1000 µL de solução salina para a contagem em câmara de Neubauer. As amostras foram, então, diluídas em PBS na concentração de 1x10<sup>6</sup> células/poço e plaqueadas.

### 3.3.4.2. Procedimento dos testes imunoenzimáticos

Após o processo de sensibilização, as placas contendo PS foram submetidas a um processo de evaporação do etanol. Para isso, elas foram deixadas, em temperatura ambiente, sob fluxo de ar por aproximadamente 2 horas. Após este processo, todas as placas foram lavadas com 150  $\mu\text{L}$  de PBS com Tween (PBST) 0,05% por 3 vezes. Após este processo, os poços foram bloqueados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS contendo 3% de albumina sérica bovina (BSA) e incubadas a 37°C por 1 hora. Os plasmas testados foram diluídos 1:100 em PBST 0,05% contendo 3% de BSA (PBST-BSA) e, 50  $\mu\text{L}$  foram adicionados, em duplicata de amostras, aos poços após o período de bloqueio. As placas foram novamente incubadas a 37°C por 2 horas para que os anticorpos presentes nos plasmas reagissem com os antígenos utilizados. Após este período, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes e 50  $\mu\text{L}$  de IgG anti-humano conjugado com HRP (Invitrogen) ou 50  $\mu\text{L}$  de IgG anti-humano conjugado à peroxidase na concentração de 1:500 e 1:2000, respectivamente, diluídos em PBST-BSA. As placas foram novamente incubadas a 37°C por 1 hora e 30 minutos. As últimas três lavagens foram realizadas após este processo e 100  $\mu\text{L}$  de substrato TMB (BD Biosciences) ou 50  $\mu\text{L}$  de OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride substrate* – Sigma Aldrich), diluído em tampão citrato-fosfato (pH 5,0), foram adicionados aos poços. As placas foram deixadas em temperatura ambiente, sob abrigo da luz, até que a coloração desejada fosse atingida. A reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{L}$ /poço de Tampão de Paragem (Biolegend) para as placas reveladas com TMB e com 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 4 N para as placas reveladas com OPD. As absorvâncias foram lidas com comprimento de onda de 450 nm ou 492 nm, respectivamente, em um leitor de microplaca VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader (PerkinElmer) ou Multiskan GO (Thermo Scientific), respectivamente. Os resultados foram expressos na forma de unidades relativas (UR), que foi obtida através da comparação da média da absorvância das duplicatas das amostras com a mesma diluição de uma amostra sabidamente positiva para cada antígeno testado. O valor de *cut-off* de cada antígeno foi estabelecido através da média somada a dois desvios padrões dos valores de unidade relativa de 7 indivíduos sabidamente não responsivos aos antígenos testados.

### **3.3.5. Ensaios de Citometria de Fluxo**

#### **3.3.5.1. Amostras e grupos de estudo**

Para realizar os experimentos de citometria de fluxo, utilizamos eritrócitos de três indivíduos infectados por *P. vivax* coletados no município de Nova Califórnia, Rondônia. Como controle, utilizamos eritrócitos de três indivíduos saudáveis nunca antes expostos à infecções por *Plasmodium* spp. Os eritrócitos estavam congelados e armazenados em nitrogênio líquido (COCKBURN et al., 2002) no Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos. Todos os eritrócitos utilizados eram do grupo sanguíneo O<sup>+</sup>. Para o ensaio, também foram utilizadas IgG purificadas do plasma de 10 indivíduos dos três grupos apresentados no subtópico 2.4.1., selecionados aleatoriamente.

#### **3.3.5.2. Purificação dos anticorpos**

Anticorpos IgG totais dos 10 indivíduos de cada grupo estudado foram individualmente purificados por cromatografia de afinidade utilizando o *kit* Protein G HP MultiTrap™ (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, as placas foram levemente agitadas para a ressuspensão do meio de conservação e os selos que cobriam a parte de cima e de baixo da placa foram retirados. Retirou-se a solução de conservação após uma centrifugação de 1 min. a 100 g. Logo após, as colunas foram equilibradas com 300 µL de tampão de ligação (20 mM fosfato de sódio, pH 7,0), agitadas brevemente e centrifugadas por 30 segundos a 100 g. 100-300 µL de plasma foi adicionado, individualmente, em cada coluna e a placa foi deixada em agitação leve em um agitador automático por 4 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo de incubação, a placa foi novamente centrifugada por 30 segundos a 100 g. Para lavar o excesso de substâncias do plasma, foi adicionado 300 µL do tampão de ligação e a placa foi submetida a nova centrifugação de 30 segundos a 100g; repetiu-se esta etapa por duas vezes. Antes da etapa de eluição, duas placas de 96 poços foi preparada contendo 15 µL do tampão neutralizante (1 M Tris-HCl, pH 9,0) por poço. Para a eluição dos anticorpos presos à coluna foi adicionado 200 µL do

tampão de eluição (0,1 M glicina-HCl, pH 2,7) e a placa foi novamente centrifugada por 30 segundos a 100 g. Realizou-se esta etapa por duas vezes, cada uma utilizando uma das placas com tampão neutralizante. Cada eluição foi analisada em NanoDrop Lite (Thermo Scientific) para verificar a presença dos anticorpos purificados.

### **3.3.5.3. Descongelamento e preparo dos eritrócitos**

Os criotubos contendo os eritrócitos congelados foram retirados, cuidadosamente, do nitrogênio líquido e rapidamente adicionados em banho-maria, previamente aquecido a 37°C, por 1 a 2 minutos. O conteúdo do tubo foi, então, transferido para um tubo Falcon de 50 mL. 200 µL de uma solução de NaCl 12% foi adicionado, lentamente e gota-a-gota, aos eritrócitos. Após esta etapa, 10 mL de uma solução NaCl 1,8% foi adicionado, lentamente, gota-a-gota, aos eritrócitos. Sem homogeneização, o conteúdo do Falcon foi submetido a uma centrifugação a 520 g, 20°C, aceleração 4, freio 1, por 5 minutos. Todo o sobrenadante foi removido com cuidado para não ressuspender ou retirar volume do *pellet*. Lentamente e gota-a-gota, foi adicionado 10 mL de uma solução NaCl 0,9%-Glicose 0,2%. Novamente o tubo foi centrifugado a 520 g, 20°C, aceleração 4, freio 1, por 5 minutos. Todo o sobrenadante foi removido e os eritrócitos foram lavados 1x com meio RPMI (520 g, 20°C, aceleração 4, freio 1, por 5 minutos). O sobrenadante foi retirado e o *pellet* de eritrócitos foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI. Para os ensaios os eritrócitos foram diluídos na proporção 2:100 em solução salina comercial.

### **3.3.5.4. Opsonização e preparo dos eritrócitos para a citometria de fluxo**

Após o descongelamento e a diluição dos eritrócitos na proporção 2:100, estas células foram devidamente plaqueadas em placas de 96 poços com fundo em U. As placas foram transportadas, em bolsa térmica com gelo, até o Instituto René Rachou no laboratório do Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores. As placas foram, então, centrifugadas a 520 g, 20°C, aceleração 4, freio 1, por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante com auxílio de uma pipeta multicanal e os *pellets* foram ressuspensionados com 50 µL solução salina contendo 0,1 mg/mL (ALLHORN et al., 2010) dos anticorpos

purificados a serem testados. As placas foram incubadas, sob agitação em agitador automático, por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após este período, as placas foram centrifugadas e lavadas 1x com solução salina a 520 g, 20°C, aceleração 4, freio 1, por 5 minutos, cada. Para a marcação dos eritrócitos e dos anticorpos opsonizados, 50 µL de solução contendo IgG anti-CD235a-PE-Cy5 (BD Biosciences) 1:400 e IgG anti-IgG humano-FITC (Sigma-Aldrich) 1:200. Como controle, utilizou-se também uma marcação com IgG anti-*band 3* BRIC6-FITC (BD Biosciences). Importante ressaltar que, nos controles que continham IgG anti-*band 3*, não foram utilizados IgG anti-IgG por possuírem o mesmo fluorocromo. Após a adição dos marcadores, as placas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, sob agitação e ao abrigo da luz. As placas foram então centrifugadas e lavadas 1x com solução salina a 520 g, 20°C, aceleração 4, freio 1, por 5 minutos, cada. Após esta etapa cada amostra foi ressuspensa em 200 µL de PBS-W e transferida para tubos de citometria para serem lidas no equipamento FACSCalibur (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram expressos na forma de intensidade mediana de fluorescência (MFI) e frequência de células verdadeiramente positivas.

Queríamos analisar, também, se o H<sub>2</sub>DIDs (*4,4'-Diisothiocyanatodihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid, disodium salt*) (Sigma-Aldrich), ao bloquear o canal iônico da *band 3*, também bloquearia ou dificultaria a ligação dos anticorpos purificados dos grupos de estudo deste trabalho. Para isso, em outro dia de experimentação, 50 µL da solução de H<sub>2</sub>DIDs, diluídos em PBS a 0,1 M foi adicionado em cada poço antes da etapa de opsonização dos eritrócitos e deixado incubando por 1 hora a 37°C, sob agitação e ao abrigo da luz. Após esta etapa, o protocolo transcorreu como descrito acima.

### 3.3.6. Análise dos dados

Criou-se um banco de dados no programa *Microsoft Excel*, contendo todas as informações referentes às características demográficas e clínicas dos pacientes incluídos neste trabalho. As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* 8.0. Avaliou-se a normalidade dos dados pelo teste estatístico de Shapiro-Wilk. Para comparar os níveis de anticorpos entre os diferentes grupos estudados, utilizaram-se os testes de *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis, e também

seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. As correlações foram analisadas utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson para grupos com distribuição normal e o teste de Spearman para grupos cuja distribuição era não paramétrica.

A técnica de estatística multivariada, utilizada neste estudo, foi a análise fatorial por meio de componentes principais (PCA), uma ferramenta que possibilita a redução da dimensionalidade de um conjunto de dados, facilitando a interpretação e evitando a perda de informações. Isso porque, cada componente principal (CP) é uma combinação linear de todas as variáveis originais, e é obtida em ordem decrescente da máxima variância. Dessa forma, n-variáveis originais geram n-componentes principais não correlacionados que contêm a maior parte da informação do conjunto original (JOLLIFE, 2002; ABDI & WILLIAMS, 2010). Para esta análise, os dados foram primeiramente normalizados, utilizando a transformação logarítmica e então submetidos à análise de PCA. Toda esta etapa foi feita utilizando o *software* R (Development Core Team, 2011) utilizando as bibliotecas MASS, factoextra e ggplot2. Para as análises dos ensaios de citometria de fluxo utilizou-se o programa FlowJo V.10 tanto para a marcação dos *gatings* quanto para o cálculo da MFI e da frequência de células verdadeiramente positivas.

## 3.4. RESULTADOS

### 3.4.1. Revisão bibliográfica publicada na *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*



# Autoantibodies and Malaria: Where We Stand? Insights Into Pathogenesis and Protection

Luiza Carvalho Mourão, Gustavo Pereira Cardoso-Oliveira and Érika Martins Braga\*

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Autoantibodies are frequently reported in patients with malaria, but whether they contribute to protection or to pathology is an issue of debate. A large body of evidence indicates that antibodies against host-self components are associated to malaria clinical outcomes such as cerebral malaria, renal dysfunction and anemia. Nonetheless, self-reactive immunoglobulins induced during an infection can also mediate protection. In light of these controversies, we summarize here the latest findings in our understanding of autoimmune responses in malaria, focusing on *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. We review the main targets of self-antibody responses in malaria as well as the current, but still limited, knowledge of their role in disease pathogenesis or protection.

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Patricia Sampaio Tavares Veras,  
Gonçalo Moniz Institute (IGM), Brazil

### Reviewed by:

Kai Yang,  
Indiana University School of  
Medicine—Lafayette, United States  
Surya Prakash Pandey,  
University of Pittsburgh, United States  
Ann M. Moormann,  
University of Massachusetts Medical  
School, United States

### \*Correspondence:

Erika Martins Braga  
embraga@icb.ufmg.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbes and Innate Immunity,  
a section of the journal  
*Frontiers in Cellular and Infection  
Microbiology*

**Received:** 03 January 2020

**Accepted:** 04 May 2020

**Published:** 11 June 2020

### Citation:

Mourão LC, Cardoso-Oliveira GP and  
Braga EM (2020) Autoantibodies and  
Malaria: Where We Stand? Insights  
Into Pathogenesis and Protection.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:262.  
doi: 10.3389/fcimb.2020.00262

**Keywords:** malaria, autoantibodies, anemia, cerebral malaria, renal dysfunction

## INTRODUCTION

Despite substantial progress in control efforts over the past decades, malaria still accounts for significant morbidity and mortality, mainly in underdeveloped countries. In 2018, an estimated 228 million cases of malaria occurred worldwide with 405,000 deaths, largely in Africa (WHO | World Malaria Report, 2019). Five species are known to cause malaria in humans, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium malariae*. Since research emphasis has been placed on *P. falciparum* and *P. vivax*, parasites that are responsible for most of malaria cases, here we will focus in these two species.

Symptomatic disease occurs during the erythrocytic phase when the presence of asexual blood-stage parasites triggers a robust innate immune response. This response if properly regulated may clear infection, contributing to the development of a protective immunity. By the other hand, if not counterbalanced by anti-inflammatory responses, the exacerbated activation of the immune system may play a key role in the pathogenesis (reviewed by Antonelli et al., 2019), leading to complications such as cerebral malaria, anemia, acute kidney injury and respiratory distress syndrome (Moxon et al., 2019).

During infection, high levels of antibodies with a broad range of specificities are elicited. Although their functional activity is far from over, it is known that such molecules can have diverse effects. Antibodies are critical for the control of the disease by acting alone or in cooperation with host immune cells (For further details see Teo et al., 2016). But in some cases, antibodies that recognize host's own components may also promote pathology (Ludwig et al., 2017).

The presence of autoantibodies that recognize the host's own molecules has also been extensively reported in patients with malaria (Rosenberg et al., 1973; Berzins et al., 1983; Daniel-Ribeiro et al., 1983; Wozencraft et al., 1990; Jakobsen et al., 1993; Lacerda et al., 2011; Fernandez-Arias et al., 2016; Mourão et al., 2016, 2018; Rivera-Correa et al., 2019a). The mechanisms by which autoimmune responses could be triggered during an infection remains unclear but it is generally

accepted that they may include: molecular mimicry (Damian, 1964; Greenwood, 1974), bystander activation (Fujinami et al., 2006; Münz et al., 2009), epitope spreading (Vanderlugt and Miller, 2002; Münz et al., 2009), persistent infection and B cells polyclonal activation (Freeman and Parish, 1978; Rosenberg, 1978; Daniel-Ribeiro et al., 1983; Minoprio, 2001).

Molecular mimicry is the sharing of structurally similar antigens between parasite and host components (Damian, 1964). In malaria, molecular mimicry occurs between *P. falciparum* translationally controlled tumor protein (PfTCTP) and human histamine-releasing factor (HRF) (MacDonald et al., 2001). Another plasmodial protein that share motifs with host's components is *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), which exhibits homology with human vitronectin (Ludin et al., 2011). An *in silico* analysis comparing *P. vivax* entire proteome and human RBC proteome also revealed that 23 *P. vivax* proteins shared similarity to human RBC proteins such as ankyrin, actin, and spectrin (Mourão et al., 2018). These structural similarities can activate cross-reactive autoreactive lymphocytes, consequently disordering the immune system. So, when T- or B- cells receptors recognize a parasite epitope that is similar enough to a self-protein, an autoimmune response is elicited, leading to cell or tissue destruction in addition to activation of other branches of the immune system (Fujinami et al., 2006; Münz et al., 2009).

Bystander activation is an antigen-independent phenomenon whereby parasitized cells, either through direct cell contact or paracrine signals, alert or instruct neighboring non-infected cells to produce inflammatory mediators (Holmgren et al., 2017). The inflammatory milieu evoked by the infection promotes the activation and expansion of autoreactive T or B cells, which can initiate an autoimmune response that damage host's cells or tissues, leading to the release of self-reactive antigens (Fujinami et al., 2006; Münz et al., 2009). Evidences of bystander activation in malaria came from *in vitro* studies investigating the pathway driving inflammation in infection. These studies have demonstrated that extracellular vesicles derived from plasma of mice infected with *Plasmodium berghei* or from *P. falciparum*-infected erythrocytes were able to activate naïve host cells (Couper et al., 2010; Mantel et al., 2013).

It is widely known that in early immune responses, epitopes of the initial antigens are recognized by the acquired immune system, but during infection, epitopes other than the dominant ones may also become immunogenic and be targets of T and B cells. This reactivity to newer endogenous epitopes is termed "epitope spreading" and may be induced against other epitopes in the same autoantigen (intramolecular epitope spreading) or against epitopes in other self-antigens (intermolecular epitope spreading) that are released after T- or B-cell-mediated bystander (Münz et al., 2009). Although epitope spreading is more commonly reported in autoimmune diseases, it may also occur in persistent infections, as it has been suggested by Flanagan et al. (2006) in a study conducted with adults naturally exposed to malaria in Kenya. These authors have investigated cellular immunity to the thrombospondin-related adhesive protein of *P. falciparum* (PfTRAP) and showed that the immunodominant response stimulated in the primary exposure to this protein

has progressed to encompass lesser epitopes with repeated and prolonged exposure.

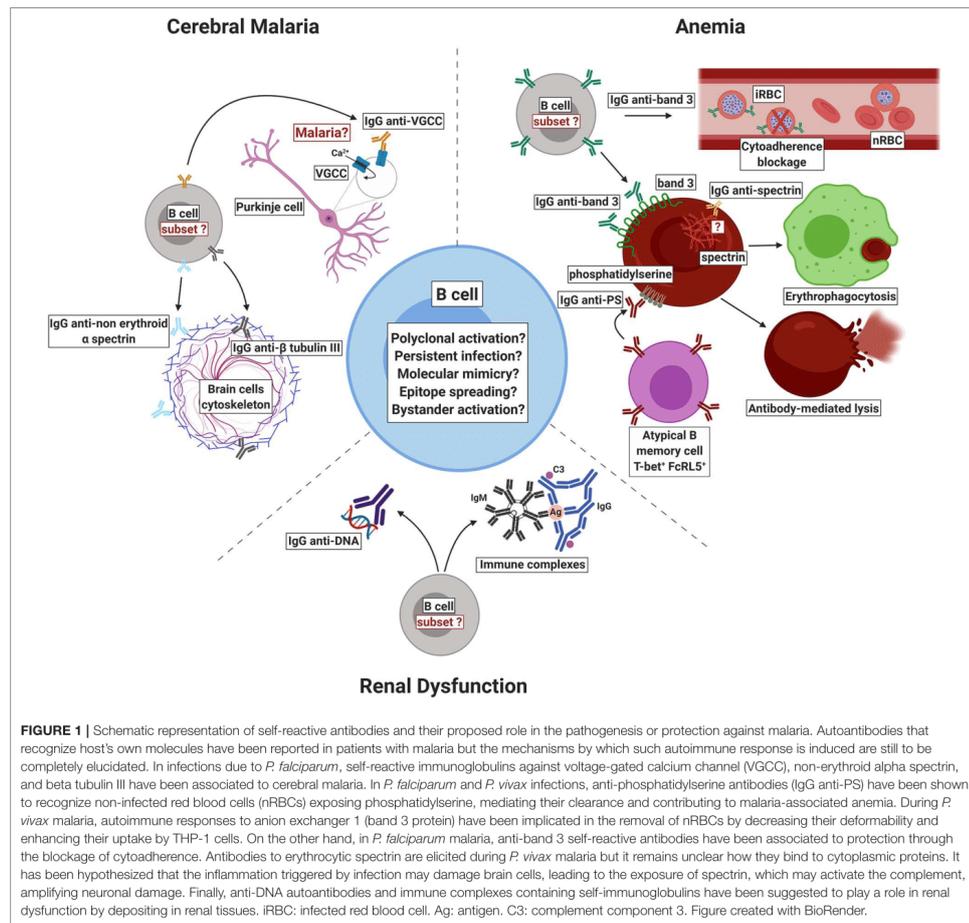
*In vitro* experiments with *P. falciparum*-infected RBCs revealed that culture supernatant containing parasite-derived products was able to induce polyclonal B-cell activation and non-specific immunoglobulin synthesis, suggesting that B-cell's proliferation and differentiation into antibody-secreting cells triggered by pathogen's molecules can also lead to autoimmune responses (Freeman and Parish, 1978; Minoprio, 2001). One of the molecules that has been incriminated as a potential activator of B-cells in malaria is the cysteine-rich interdomain region 1 (CIDR1) of *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP-1). Evidence in this line has been provided by a study with B cells from non-immune donors stimulated with a recombinant version of CIDR1. The recombinant protein was able to promote *in vitro* proliferation, increase in B-cell size, and expression of immunoglobulins and cytokines in those cells (Donati et al., 2004). However, just a small proportion of antibodies secreted by them was specific for parasite antigens; the greater part was non-specific and could react with different host's components, leading to cell and tissue damage.

Self-reactive antibodies recognize different self-antigens such as erythrocyte proteins (Rosenberg et al., 1973; Fontaine et al., 2010; Mourão et al., 2016, 2018; Ventura et al., 2018), brain molecules (Bansal et al., 2009; Gitau et al., 2013), phospholipids (Adebajo et al., 1993; Jakobsen et al., 1993; Facer and Agiostratidou, 1994; Fernandez-Arias et al., 2016; Barber et al., 2019; Rivera-Correa et al., 2019a,b), and nucleic acids (Adu et al., 1982; Adebajo et al., 1993; Rivera-Correa et al., 2019b). Although the literature reporting the detection of autoantibodies in plasmodial infections is vast, the role of such molecules in malaria is still a controversial issue. Some authors have associated such autoimmune responses to pathology while others to protection. In this review, we summarize the latest breakthroughs regarding autoantibody responses in malaria, emphasizing what is new on the pathogenesis front, mainly with respect to cerebral malaria, kidney injury and anemia (Figure 1).

## CEREBRAL MALARIA

Cerebral malaria (CM) is a clinical syndrome of severe falciparum malaria characterized by impaired consciousness assessed by Blantyre Coma Score  $\leq 2$  in children (Molyneux et al., 1989) or Glasgow Coma Score  $\leq 11$  in adults (Teasdale and Jennett, 1974), with no other cause of encephalitis (Taylor et al., 2004). Although this neurological syndrome only develops in a small percentage of *P. falciparum*-infected patients, it is responsible for more than 90% of malaria-related deaths. The treatment with anti-malarial drugs decreases mortality due to CM, but nearly 20% of treated patients still succumb and up to one-third of survivors frequently exhibit long-term neurological sequelae such as cognition and speech disorders, physical disability and cortical blindness (Birbeck et al., 2010).

Although the mechanisms leading to CM pathogenesis are not yet clearly defined, it is known that both parasite and host factors play a role in the clinical outcome of this syndrome (Idro



et al., 2010). Among host components, B cells and antibodies are critical for the immune response against malaria. Large amounts of antibodies are produced in response to plasmodial infection, including those that recognize self-components such as host brain antigens (Guiyedi et al., 2007; Bansal et al., 2009; Duarte et al., 2012). However, whether such self-reactive immunoglobulins are a consequence of cerebral malaria or a factor that aggravates the disease is little explored. This could be, in part, due to the difficult in accessing human brain tissues because of the small proportion of *P. falciparum*-infected patients that develop CM. Moreover, the existence of ethical issues limits the study of CM to peripheral blood and *post-mortem* samples.

Although understudied, some research groups have associated a marked increase in specific anti-brain autoantibodies levels with disease severity in *P. falciparum* malaria. This is the case of self-reactive antibodies against the voltage-gated calcium channels (VGCCs), whose levels were shown to be higher in Kenyan children with CM than in those with uncomplicated disease or uninfected (Lang et al., 2005). Autoantibodies to VGCCs have been shown to downregulate calcium flow in Purkinje neurons and granule cells through a complement-independent process in autoimmune diseases such as limbic encephalitis and cerebellar ataxia (Pinto et al., 1998; Irani and Lang, 2008), thereby providing insight into the pathogenic role of such self-reactive molecules in malaria.

Furthermore, it has been reported that serum from Gabonese children with severe *P. falciparum* infection recognize a higher diversity of brain antigens in comparison to non-infected ones. Some of those autoantibodies display reactivity to the non-erythroid alpha spectrin (Guiyedi et al., 2007), a structural protein that is found in the cytoplasm of a variety of brain cells and is responsible for membrane structure and integrity. Since inflammation induced by malaria can damage brain cells exposing non-erythroid alpha spectrin, it is possible that this protein activates the complement system, amplifying the neuronal damage. In primary Sjögren's syndrome, an important autoimmune disease, non-erythroid spectrin undergoes proteolysis by caspase 3 and calpain, producing a fragment that acts as autoantigen (Nath et al., 1996; Haneji et al., 1997).

Other cytoskeletal protein that has also been described as a target of autoimmune responses in CM and which is considered as a disease-specific marker is beta tubulin III (TBB3) (Bansal et al., 2009), a protein that is abundant in cells from nervous system and in neoplastic cells of neural tumors (Katsatos et al., 2003). TBB3 is involved in axon guidance, thus mutations in this protein are associated with different nervous system disorders (Tischfield et al., 2010). In living cells and *in vitro* models, polyclonal antibodies with high affinity for beta tubulin have been shown to disrupt cytoplasmic microtubules, leading to their fragmentation into smaller units (Füchtbauer et al., 1985).

In addition to the self-reactive proteins mentioned above, the dendritic tree of Purkinje cell is another host component that has been considered a target of autoimmune responses in CM. In a cohort of Thai individuals, it has been demonstrated that levels of autoantibodies against dendrites are higher in *P. falciparum*-infected patients with CM than in those with uncomplicated malaria (Gallien et al., 2011). The pathogenic role of such autoantibodies was attributed to their ability in inhibiting *in vitro* development of Purkinje cells (Calvet et al., 1993). However, it is important to emphasize that these results were obtained from studies conducted with cat brain biopsies and thus, should be interpreted with caution.

On the other hand, a possible role in protection against severe *P. falciparum* malaria has already been suggested for self-reactive antibodies induced during plasmodial infection. This is the case of IgE autoantibodies to 14-3-3  $\epsilon$  brain protein, which induce *in vitro* mastocyte degranulation (Duarte et al., 2012). The 14-3-3  $\epsilon$  brain protein belongs to a family of adaptor proteins that interact with a multitude of binding partners that contain PSer/PThr motifs. Through this interaction, 14-3-3  $\epsilon$  protein affects the activity and localization of various substrate proteins, regulating signal cascades of a wide range of biological activities, including cell cycle and apoptosis (Cornell and Toyooka, 2017). Therefore, 14-3-3  $\epsilon$  protein has been implicated in different neurodegenerative and neuropsychiatric diseases by mechanisms that vary from apoptosis to protein stabilization and aggregation (For further details see Foote and Zhou, 2012 and Cornell and Toyooka, 2017). In Parkinson's disease, for example, the interaction of 14-3-3  $\epsilon$  protein with Bad and Bax proteins prevents neurons apoptosis. Neurodegeneration is avoided by interaction between 14-3-3  $\epsilon$  protein and phosphorylated tyrosine hydroxylase in parallel with the binding

between  $\alpha$ -synuclein to unphosphorylated tyrosine hydroxylase. An imbalance in those interactions leads to neurodegeneration in this nervous system disorder (Shimada et al., 2013). Thus, it is not surprising that an antibody response against 14-3-3  $\epsilon$  brain protein exert neuroprotective properties, as it has already been demonstrated in glaucoma, using a neuro-retinal cell line of mouse origin. In this case, cell viability and reduced reactive oxygen species levels were considered predictors of protection (Bell et al., 2015).

As highlighted herein, the repertoire of brain antigens that are targets of autoimmune responses during CM is vast and depends on a complex interplay of host, parasite and environmental factors. However, whether such autoantibodies have a pathogenic relevance, can be considered biomarkers of neuropathology or are merely innocent by-standers remains a focus of debate. More studies are needed in order to elucidate this, as well as to determine the epitopes, function and origin of such self-reactive immunoglobulins. Even though it is known that a breach in the blood brain barrier's (BBB) integrity is necessary to allow antibody influx into the brain (Huerta et al., 2006), studies conducted with *post mortem* brain tissues from Malawian children with fatal cerebral malaria revealed that, although BBB breakdown occurs in vessels containing cytoadherent parasitized RBCs, no gross leakage of plasma proteins occurs (Brown et al., 2001). Thus, the mechanisms by which immunoglobulins gain access to brain tissue are another issue that is still to be elucidated. Do they cross the BBB independently or do plasma cells secrete them? Further studies are necessary to understand in more details how BBB breakdown occurs in malaria. Understanding how this happens may provide new opportunities to find agents that are able to open the BBB, allowing the delivery of different molecules and shedding light on the effects of antibodies in the brain tissue. This knowledge may pave the way for the development of future interventions for malaria and other neurological diseases.

## RENAL DYSFUNCTION

Acute renal failure is most reported in *P. falciparum* infections (Frutakul et al., 1974; Burchard et al., 2003; von Seidlein et al., 2012; Conroy et al., 2016; Sypniewska et al., 2017; Rivera-Correa et al., 2019b), but this complication can occasionally occur in infection due to *P. malariae* (Neri et al., 2008; Badiane et al., 2016). Renal failure is considered a clinical manifestation with high prognostic value to severe malaria (von Seidlein et al., 2012; Sypniewska et al., 2017). In *P. malariae* infection, renal failure affects most children and is presented as steroid-resistant nephrotic syndrome. The pathogenesis is possibly mediated through immune-complex deposition containing IgM, IgG, C3, and malarial antigens in mesangiocapillary, glomerular, proximal tubules and subendothelial kidney tissues, with rarely IgA deposition (Ward and Kibuka-Musoke, 1969; Houba et al., 1971; van Velthuisen and Florquin, 2000; Das, 2008). Chronic glomerular disease due to *P. malariae* infection is usually not reversible even after treatment, raising the hypothesis that genetic and environmental factors are also involved (Houba, 1979). Although it is well-known that *P. malariae*-associated

renal impairment is caused mainly because of immune complex deposits, there are no studies investigating if autoantibodies are involved in this process.

In *P. falciparum* malaria, acute renal failure is a common and serious complication in non-immune adults and adolescents and is more frequent in patients from non-endemic regions (Barsoum, 2000; Elsheikha and Sheashaa, 2007; Nguansangiam et al., 2007), but it can also occur in pediatric severe malaria (Olowu and Adelusola, 2004; von Seidlein et al., 2012; Conroy et al., 2016; Sypniewska et al., 2017; Rivera-Correa et al., 2019b). Although it is an important clinical manifestation associated with mortality and morbidity, the pathogenesis of renal failure in *P. falciparum* malaria is not well understood. However, unlikely *P. malariae*-associated renal failure, acute kidney injury in *P. falciparum* infection is usually transient and disappears after treatment (van Velthuysen and Florquin, 2000), suggesting that the parasite does not have a great role in the pathogenesis that is most likely to be caused by host's immune response. Several hypothesis on the pathogenesis of malarial renal failure have been proposed, including mechanical obstruction of glomerular and tubulointerstitial capillaries by infected erythrocytes (Seydel et al., 2006; Nguansangiam et al., 2007), possibly leading to renal ischemia (Conroy et al., 2016); immune complex deposits leading to renal impairment (Frutakul et al., 1974); and autoantibodies against nucleic acids (Wozencraft et al., 1990; Rivera-Correa et al., 2019b).

In a children population from Uganda, Rivera-Correa et al. (2019b) demonstrated that infants with severe *P. falciparum* malaria manifesting acute kidney injury have autoantibodies against nucleic acid and lipids. Additionally, they found a correlation between those autoantibodies and creatinine and blood urea nitrogen levels, two indicators of kidney health, suggesting that such immunoglobulins may play a role in kidney injury. It was also shown that anti-DNA autoantibodies were elevated in children with acute kidney injury, a result that is in accordance with Wozencraft et al. (1990), who obtained similar data, however, in mouse malaria. It is important to mention that no difference was found in levels of antibodies against parasite antigen, indicating that systemic changes in IgG metabolism and immune-mediated pathways may contribute to malaria-associated renal failure. This result corroborates the findings from Frutakul et al. (1974), who reported an absence of antibodies against parasite antigens in immune complexes deposited in glomeruli capillary walls from a Thai child's kidney. All these data demonstrate that renal dysfunction due to autoantibodies may be relevant in severe *P. falciparum*-associated renal failure. Future investigations should be conducted to further understand the role of those autoantibodies, their involvement in renal pathogenesis, as well as their use as disease biomarkers.

## ANEMIA

Anemia is the most common feature and a major concern in malaria, mainly in young children and pregnant women (Accrombessi et al., 2015; Kenangalem et al., 2016; White, 2018).

Despite its relevance, the pathogenesis of malaria-associated anemia is complex, and still incompletely understood. Malaria-induced anemia is thought to arise from the rupture of infected and non-infected red blood cells (nRBCs), as well as inappropriate erythropoiesis in the erythroid germinal centers (Douglas et al., 2012; White, 2018). But the greater loss is due to the clearance of nRBCs, which persist long after infection has resolved (Looareesuwan et al., 1987; Ritter et al., 1993; Collins et al., 2003; Douglas et al., 2012). An autoimmune component has been suggested to explain this removal, although the mechanisms underlying autoimmunity in malarial anemia have not been thoroughly explored (White, 2018; Rivera-Correa and Rodriguez, 2019). Self-reactive antibodies that recognize RBCs have been documented in plasmodial infections since 1970s, when host-serum components associated with the surface of nRBCs were detected in patients with malaria using different methodologies (Rosenberg et al., 1973; Facer et al., 1979; Berzins et al., 1983; Fernandez-Arias et al., 2016; Mourão et al., 2016). However, their roles in the pathophysiology of anemia have not been thoroughly explored. Evidence in this line is given by studies that have shown a reduction in RBC life span following the clearance of *P. falciparum* (Looareesuwan et al., 1987). This reduction in RBC survival time has been observed mainly in anemic patients and is associated with the deposition of complement containing immune complexes on RBCs surface (Rosenberg et al., 1973). Furthermore, it has been demonstrated that autoantibodies against triosephosphate isomerase purified from patients with *P. falciparum* malaria can bind to RBCs, promoting their lysis and activating complement cascade thereby, contributing to anemia (Ritter et al., 1993).

Since these early findings, autoantibodies with other specificities have already been identified and associated to anemia in malaria. This is the case of anti-phosphatidylserine (PS) antibodies, which were found to tag nRBCs exposing phosphatidylserine (Fernandez-Arias et al., 2016; Barber et al., 2019; Rivera-Correa et al., 2019a). These self-reactive immunoglobulins have been shown to increase *in vitro* phagocytosis and *in vivo* clearance of nRBCs, contributing to malarial anemia in a murine model (Fernandez-Arias et al., 2016). Moreover, a negative correlation between the magnitude of anti-PS antibodies and hemoglobin levels has been reported for patients infected with *P. falciparum* and *P. vivax* (Barber et al., 2019; Rivera-Correa et al., 2019a,b). In addition, it has been demonstrated that a population of atypical B cells, which is characterized by the expression of CD11c and T-bet, secretes anti-PS antibodies. The activation of these cells has been shown to be dependent of parasite DNA and different receptors have been suggested to be involved such as interferon- $\gamma$  receptor (IFN- $\gamma$ R), B-cell receptor (BCR) and Toll-like receptor 9 (TLR9) (Rivera-Correa et al., 2017). However, the role of such atypical cells in human malaria was still unknown until a recent evidence has emerged from a study conducted with *P. falciparum*-infected returned travelers (Rivera-Correa et al., 2019a). In this study, it has been shown that FcRL5<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> B-cells are expanded in acute malaria. Additionally, it has been observed that naive human peripheral blood mononuclear cells are able to produce anti-PS antibodies when stimulated with lysates of *P. falciparum*-infected

**TABLE 1** | Autoantibodies against self-antigens and their implications in *P. falciparum* and *P. vivax* malaria.

Self antigen	Possible functional activity of self-reactive antibody	Clinical outcome	References
14-3-3 $\epsilon$ brain protein	Degranulation of mast cells, basophils, eosinophils and/or monocytes/macrophages	Protection against severe <i>Plasmodium falciparum</i> malaria	Duarte et al., 2012
Beta tubulin III (TBB3)	Cytoplasm microtubule disruption	Cerebral malaria associated to <i>P. falciparum</i>	Füchtbauer et al., 1985; Bansal et al., 2009
Dendritic tree of Purkinje cell	<i>In vitro</i> inhibition of Purkinje cells development	Cerebral malaria associated to <i>P. falciparum</i>	Calvet et al., 1993; Gallien et al., 2011
Erythrocyte band 3 protein	Rigidity increase and <i>in vitro</i> clearance of non-parasitized RBCs	Anemia associated to <i>Plasmodium vivax</i>	Mourão et al., 2016, 2018
	<i>In vitro P. falciparum</i> cytho adherence blockage and <i>in vivo</i> adherence of RBCs; parasite growth inhibition	Protection against <i>P. falciparum</i> malaria	Hogh et al., 1994 ; Brahimi et al., 2011
Lipids	Kidney injury through immune complex deposition	Renal failure associated to <i>P. falciparum</i> malaria	Frutakul et al., 1974; Rivera-Correa et al., 2019b
Non-erythroid alpha spectrin	Disruption of brain cells cytoskeleton; complement activation and amplification of neuronal damage	Cerebral malaria associated to <i>P. falciparum</i>	Guiyedi et al., 2007
Nucleic acids	Kidney injury through immune complex deposition	Renal failure associated to <i>P. falciparum</i> malaria	Frutakul et al., 1974; Rivera-Correa et al., 2019b
Phosphatidylserine	Phagocytosis ( <i>in vitro</i> ) and clearance of non-parasitized RBCs	Anemia associated to <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i>	Fernandez-Arias et al., 2016; Barber et al., 2019; Rivera-Correa et al., 2019a
Spectrin	Disruption of RBCs cytoskeleton; amplification of RBCs damage	Anemia associated to <i>P. vivax</i>	Mourão et al., 2018
Triose-phosphate isomerase	<i>In vitro</i> lysis of RBC and activation of complement	Anemia associated to <i>P. falciparum</i>	Ritter et al., 1993
Voltage-gated calcium channels (VGCC)	Complement-independent downregulation of calcium flow in Purkinje and granule cells	Cerebral malaria associated to <i>P. falciparum</i>	Lang et al., 2005

RBCs, highlighting such atypical subset of memory B cells as a major promoter of autoimmune anemia in malaria. Besides anti-PS antibodies, self-reactive immunoglobulins triggered by other host cell targets are also involved in RBCs lysis, as it has been evidenced in a complement lysis assay using annexin V to block the binding of anti-PS antibodies to phosphatidylserine. After the binding of annexin to PS, RBC lysis could be partially inhibited by plasma from *P. falciparum*-infected patients (Rivera-Correa et al., 2019a).

Autoantibodies against RBCs have also been described for *P. vivax* infections (Mourão et al., 2016, 2018; Ventura et al., 2018; Barber et al., 2019). However, since this parasite has unique biological features that restricts its invasion to reticulocytes, lower densities of peripheral parasitemia are generally expected for infections due to *P. vivax* in comparison to *P. falciparum*. But despite this, *P. vivax* causes a greater loss of nRBCs. Thus, it is possible that the mechanisms leading to nRBCs removal in *P. vivax* malaria are distinct from those observed from *P. falciparum*. More work is needed to elucidate this.

Different erythrocytic antigens have been shown to be recognized by self-reactive immunoglobulins from anemic *P. vivax*-infected patients such as band 3 (Mourão et al., 2018), an anion exchanger protein which mediates the change of intracellular bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) to extracellular chloride ( $\text{Cl}^-$ ) (Cordat and Reithmeier, 2014). Since IgGs purified from the same patients can bind to the surface of non-parasitized RBCs,

increasing their rigidity and enhancing their clearance by THP-1 phagocytes (Mourão et al., 2018), it is also possible that anti-RBCs antibodies mediate malarial anemia through erythrophagocytosis or through decreasing RBC deformability (Mourão et al., 2016). Other possibility is the withdrawn from circulation by mechanisms like those tagging senescent RBCs for clearance (Lutz and Bogdanova, 2013), a hypothesis that should be better investigated.

Other RBC protein that has also been considered a target for autoimmune responses during *P. vivax* malaria is spectrin, although it is still unclear how anti-spectrin antibodies bind to an inner component of RBC membrane. Since *in silico* analysis revealed that human spectrin primary structure shares homology with a *P. vivax* hypothetical protein, it is possible that molecular mimicry drives autoimmune response against human spectrin (Mourão et al., 2018), a hypothesis that needs to be experimentally validated.

On the other hand, no association between anti-RBCs antibodies and anemia has been observed in a study conducted with *P. vivax*-infected children and adolescents from Pará, a State located in Brazilian Amazon (Ventura et al., 2018). A similar result was also found by (Fernandes et al., 2008), who evaluated the frequency of malarial anemia, as well as cytokines and autoantibodies levels, in an area in which *P. vivax* and *P. falciparum* coexists. It is important to mention that despite no significant association has been found in both studies,

**BOX 1** | Outstanding questions in autoimmunity-mediated pathology in malaria:

- Which mechanisms are behind the generation of self-reactive antibodies in malaria?
- What are the self-antigens that trigger auto-immune responses in *P. falciparum* and *P. vivax* malaria?
- How self-reactive antibodies penetrate the blood-brain barrier, a high selective barrier that protects the central nervous system from invaders? Do they cross independently or do plasma cells secrete them?
- Do self-reactive antibody responses change with anti-malarial therapy?
- Is there any association between autoantibodies that persist after parasite clearance and long-term complications?
- What is the prevalence and the magnitude of autoantibody responses in different epidemiological settings?
- Can anti-self-antibody blockage prevent pathology?

higher frequency of anti-RBCs antibodies has been reported in patients with malaria (Fernandes et al., 2008; Ventura et al., 2018).

In other reports, a beneficial role has been attributed to anti-RBCs antibodies. This is the case of a study carried out in an area of intense transmission of malaria in Liberia, where it has been shown that immune responses to band 3 neoantigens are correlated with lower *P. falciparum* parasitemia and can block *in vitro* and *in vivo* RBCs' cytoadherence (Hogh et al., 1994). Moreover, an anti-plasmodial activity has been proposed to autoantibodies from patients with autoimmune diseases, which were able to inhibit parasite growth, suggesting a protective role for those molecules, although the authors have not ruled out the involvement of other serum components (Brahimi et al., 2011). Since the pathways involved in autoantibody-induced pathology differ among infections due to different parasites, it is possible that self-reactive antibodies exert diverse effects in infections by *P. vivax* and *P. falciparum*, an issue that should be target of future investigation.

As can be noted by the findings mentioned above, the literature concerning self-reactive antibodies against RBCs suggest a dual role for these immunoglobulins in malaria-associated anemia. But crucial gaps remain to be addressed (Box 1).

These scientific breakthroughs will allow the use of autoantibodies as signatures to predict disease severity

or protection, as well as provide insights toward the best vaccination strategies. Furthermore, they will open new therapeutic possibilities to treat malarial anemia.

## CONCLUDING REMARKS

Studies regarding autoantibodies and plasmodial infections have indicated that those molecules may play a dual role in malaria (Figure 1 and Table 1). However, it is not clear if self-reactive antibodies lead to pathogenesis or are just a consequence of plasmodial infection. Although different self-reactive antibodies have been identified in distinct populations and associated with clinical complications, their epitopes as well as their origin and functional role remains to be elucidated. This information will be essential to the search and identification of epitopes and other molecules that can hijacks pathogenic autoantibodies from circulation, minimizing or inhibiting their pathogenic effects in host cells. This is an interesting field of work that should be focus of future investigation using *in vitro* and *in vivo* models. Since few reports have associated autoantibodies to protection, this is an issue that should also be better investigated. Additionally, it would be of interest to determine the prevalence and the magnitude of self-reactive responses in cohorts from different epidemiological settings, an analysis that should be extended including prospective studies. The role of self-immunoglobulins isotypes and IgG subclasses is another gap that should also be addressed. A better knowledge of all these points (Box 1) may allow the use of autoantibodies as signatures to predict malaria clinical outcome. Furthermore, it may open new therapeutic possibilities to treat malaria-associated complications besides have implications for other autoimmune diseases.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM, GC-O, and EB conceptualized and wrote the manuscript.

## FUNDING

Funding for preparation of this review: CNPq (404365/2016-7 and 154378/2018-6), CAPES (88887.472593/2019-00), FAPEMIG (APQ-00361-16).

## REFERENCES

- Accrombessi, M., Ouédraogo, S., Agbota, G. C., Gonzalez, R., Massougbedji, A., Menéndez, C., et al. (2015). Malaria in pregnancy is a predictor of infant haemoglobin concentrations during the first year of life in Benin, West Africa. *PLoS ONE* 10:e0129510. doi: 10.1371/journal.pone.0129510
- Adebajo, A. O., Charles, P., Maini, R. N., and Hazleman, B. L. (1993). Autoantibodies in malaria, tuberculosis and hepatitis B in a west African population. *Clin. Exp. Immunol.* 92, 73–76. doi: 10.1111/j.1365-2249.1993.tb05950.x
- Adu, D., Williams, D. G., Quakyi, I. A., Voller, A., Anim-Addo, Y., Bruce-Tagoe, A. A., et al. (1982). Anti-ssDNA and antinuclear antibodies in human malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 49, 310–316
- Antonelli, L. R., Junqueira, C., Vinetz, J. M., Golenbock, D. T., Ferreira, M. U., and Gazzinelli, R. T. (2019). The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunol. Rev.* 293, 163–189. doi: 10.1111/imr.12816
- Badiane, A. S., Diongue, K., Diallo, S., Ndongo, A. A., Diedhiou, C. K., Deme, A. B., et al. (2016). Acute kidney injury associated with *Plasmodium malariae* infection. *Malar. J.* 13:226. doi: 10.1186/1475-2875-13-226
- Bansal, D., Herbert, F., Lim, P., Deshpande, P., Bécavin, C., Guiyedi, V., et al. (2009). IgG autoantibody to brain beta tubulin III associated with cytokine

- cluster-II discriminate cerebral malaria in central India. *PLoS ONE* 4:e8245. doi: 10.1371/journal.pone.0008245
- Barber, B. E., Grigg, M. J., Piera, K., Amante, F. H., William, T., Boyle, M. J., et al. (2019). Antiphosphatidylserine immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies are higher in vivax than falciparum malaria, and associated with early anemia in both species. *J. Infect. Dis.* 220, 1435–1443. doi: 10.1093/infdis/jiz334
- Barsoum, R. S. (2000). Malarial acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2147–2154. doi: 10.1046/1523-1749.11111-2147
- Bell, K., Wilding, C., Funke, S., Pfeiffer, N., and Grus, F. H. (2015). Protective effect of 14-3-3 antibodies on stressed neuroretinal cells via the mitochondrial apoptosis pathway. *BMC Ophthalmol.* 15:64. doi: 10.1186/s12886-015-0044-9
- Berzins, K., Wahlgen, M., and Perlmann, P. (1983). Studies on the specificity on anti-erythrocyte antibodies in the serum of patients with malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 54, 313–318.
- Birbeck, G. L., Molyneux, M. E., Kaplan, P. W., Seydel, K. B., Chimalizeni, Y. F., Kawaza, K., et al. (2010). Blantyre malaria project epilepsy study (BMPEs) of neurological outcomes in retinopathy-positive paediatric cerebral malaria survivors: a prospective cohort study. *Lancet* 9, 1173–1181. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70270-2
- Brahimi, K., Martins, Y. C., Zanini, G. M., Ferreira-da-Cruz, M. F., and Daniel-Ribeiro, C. T. (2011). Monoclonal auto-antibodies and sera of autoimmune patients react with *Plasmodium falciparum* and inhibit its *in vitro* growth. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 44–51. doi: 10.1590/s0074-02762011000900006
- Brown, H., Rogerson, S., Taylor, T., Tembo, M., Mwenechanya, J., Molyneux, M., et al. (2001). Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 207–213. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.207
- Burchard, G. D., Ehrhardt, S., Mockenhaupt, F. P., Mathieu, A., Agana-Nsire, P., Anemana, S. D., et al. (2003). Renal dysfunction in children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Tamale, Ghana. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 97, 345–350. doi: 10.1179/000349803235002281
- Calvet, M. C., Druilhe, P., Camacho-García, R., and Calvet, J. (1993). Culture medium for the study of cerebral malaria: antibodies from *Plasmodium falciparum*-infected comatose patients inhibit the dendritic development of Purkinje cells. *J. Neurosci. Res.* 36, 235–240. doi: 10.1002/jnr.490360214
- Collins, W. E., Jeffery, G. M., and Roberts, J. M. (2003). A retrospective examination of anemia during infection of humans with *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med.* 68, 410–412.
- Conroy, A. L., Hawkes, M., Elphinstone, R. E., Morgan, C., Hermann, L., Barker, K. R., et al. (2016). Acute kidney injury is common in pediatric severe malaria and is associated with increased mortality. *Open Forum Infect. Dis.* 3:ofw046. doi: 10.1093/ofid/ofw046
- Cordat, E., and Reithmeier, R. A. (2014). Structure, function, and trafficking of SLC4 and SLC26 anion transporters. *Curr. Top. Membr.* 73, 1–67. doi: 10.1016/B978-0-12-800223-0.00001-3
- Cornell, B., and Toyo-Oka, K. (2017). 14-3-3 proteins in brain development: neurogenesis, neuronal migration and neuromorphogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 10:318. doi: 10.3389/fnmol.2017.00318
- Couper, K. N., Barnes, T., Hafalla, J. C. R., Combes, V., Ryffel, B., Secher, T., et al. (2010). Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog.* 6:e1000744. doi: 10.1371/journal.ppat.1000744
- Damian, R. T. (1964). Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Nat.* 98, 129–149.
- Daniel-Ribeiro, C., Druilhe, P., Monjour, L., Homberg, J. C., and Gentilini, M. (1983). Specificity of auto-antibodies in malaria and the role of polyclonal activation. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 185–188. doi: 10.1016/0035-9203(83)90064-0
- Das, B. S. (2008). Renal failure in malaria. *J. Vector Borne Dis.* 45, 83–97.
- Donati, D., Zhang, L. P., Chêne, A., Chen, Q., Flick, K., Nyström, M., et al. (2004). Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 72, 5412–5418. doi: 10.1128/IAI.72.9.5412-5418.2004
- Douglas, N. M., Anstey, N. M., Buffet, P. A., Poesoprodjo, J. R., Yeo, T. W., White, N. J., et al. (2012). The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar. J.* 11:135. doi: 10.1186/1475-2875-11-135
- Duarte, J., Herbert, F., Guiyedi, V., Franetich, J. F., Roland, J., Cazenave, P. A., et al. (2012). High levels of immunoglobulin E autoantibody to 14-3-3 epsilon protein correlate with protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 206, 1781–1789. doi: 10.1093/infdis/jis595
- Elsheikha, H. M., and Sheashaa, H. A. (2007). Epidemiology, pathophysiology, management and outcome of renal dysfunction associated with plasmodia infection. *Parasitol. Res.* 101, 1183–1190. doi: 10.1007/s00436-007-0650-4
- Facer, C. A., and Agiostratidou, G. (1994). High levels of anti-phospholipid antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 95, 304–309. doi: 10.1111/j.1365-2249.1994.tb06528.x
- Facer, C. A., Bray, R. S., and Brown, J. (1979). Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. I. incidence and class specificity. *Clin. Exp. Immunol.* 35, 119–127.
- Fernandes, A. A., Carvalho, L. J., Zanini, G. M., Ventura, A. M., Souza, J. M., Cotias, P. M., et al. (2008). Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 650–658. doi: 10.1128/CVI.00475-07
- Fernandez-Arias, C., Rivera-Correa, J., Gallego-Delgado, J., Rudlaff, R., Fernandez, C., Roussel, C., et al. (2016). Anti-self-phosphatidylserine antibodies recognize uninfected erythrocytes promoting malarial anemia. *Cell Host Microbe.* 19, 194–203. doi: 10.1016/j.chom.2016.01.009
- Flanagan, K. L., Plebanski, M., Odhiambo, K., Sheu, E., Mwangi, T., Gelder, C., et al. (2006). Cellular reactivity to the *P. falciparum* protein TRAP in adult kenians: novel epitopes, complex cytokine patterns, and the impact of natural antigenic variation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 367–375.
- Fontaine, A., Pophillat, M., Bourdon, S., Villard, C., Belghazi, M., Fourget, P., et al. (2010). Specific antibody responses against membrane proteins of erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum* of individuals briefly exposed to malaria. *Malar. J.* 9:276. doi: 10.1186/1475-2875-9-276
- Foote, M., and Zhou, Y. (2012). 14-3-3 proteins in neurological disorders. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 152–164.
- Freeman, R. R., and Parish, C. R. (1978). Polyclonal B-cell activation during rodent malarial infections. *Clin. Exp. Immunol.* 32, 41–45.
- Frutakul, P., Boonpucknavig, V., Boonpucknavig, S., Mitrakul, C., and Bhamarapravati, N. (1974). Acute glomerulonephritis complicating *Plasmodium falciparum* infection. *Clin. Pediatr.* 13, 281–283. doi: 10.1177/00092287401300315
- Füchtbauer, A., Herrmann, M., Mandelkowl, E., and Jockusch, M. (1985). Disruption of microtubules in living cells and cell models by high affinity antibodies to beta-tubulin. *EMBO J.* 4, 2807–2814.
- Fujinami, R. S., von Herrath, M. G., Christen, U., and Whitton, J. L. (2006). Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 80–94. doi: 10.1128/CMR.19.1.80-94.2006
- Gallien, S., Roussilhon, C., Blanc, C., Pérignon, J. L., and Druilhe, P. (2011). Autoantibody against dendrite in *Plasmodium falciparum* infection: a singular auto-immune phenomenon preferentially in cerebral malaria. *Acta Trop.* 118, 67–70. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.01.005
- Gitau, E. N., Kokwaro, G. O., Karanja, H., Newton, C. R., and Ward, S. A. (2013). Plasma and cerebrospinal proteomes from children with cerebral malaria differ from those of children with other encephalopathies. *J. Infect. Dis.* 208, 1494–1503. doi: 10.1093/infdis/jit334
- Greenwood, B. M. (1974). Possible role of a B-cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet* 1, 435–436. doi: 10.1016/s0140-6736(74)92386-1
- Guiyedi, V., Chanseaud, Y., Fesel, C., Snounou, G., Rousselle, J. C., Lim, P., et al. (2007). Self-reactivities to the non-erythroid alpha spectrin correlate with cerebral malaria in Gabonese children. *PLoS ONE* 2:e389. doi: 10.1371/journal.pone.0000389
- Haneji, N. T., Nakamura, K., Takio, K., Yanagi, H., and Higashiyama, I. (1997). Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Science*, 276, 604–607. doi: 10.1126/Science.276.5312.604
- Hogh, B., Petersen, E., Crandall, I., Gottschau, A., and Sherman, I. W. (1994). Immune responses to band 3 neoantigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in subjects living in an area of intense malaria transmission are associated with low parasite density and high hematocrit value. *Infect. Immunol.* 62, 4362–4366.

- Holmgren, A. M., McConkey, C. A., and Shin, S. (2017). Outrunning the red queen: bystander activation as a means of outpacing innate immune subversion by intracellular pathogens. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 14–21.
- Houba, V. (1979). Immunologic aspects of renal lesions associated with malaria. *Kidney Int.* 16, 3–8. doi: 10.1038/ki.1979.96
- Houba, V., Allison, A. C., Adeniji, A., and Houba, J. E. (1971). Immunoglobulin classes and complement biopsies of Nigerian children with the nephrotic syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 8, 761–774.
- Huerta, P. T., Kowal, C., DeGiorgio, L. A., Volpe, B. T., Diamond, B. (2006). Immunity and behavior: antibodies alter emotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 678–683. doi: 10.1073/pnas.0510055103
- Idro, R., Marsh, K., John, C. C., Newton, C. R. (2010). Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr. Res.* 68, 267–274. doi: 10.1203/00006450-201011001-00524
- Irani, S., and Lang, B. (2008). Autoantibody-mediated disorders of the central nervous system. *Autoimmunity* 41, 55–65. doi: 10.1080/08916930701619490
- Jakobsen, P. H., Morris-Jones, S. D., Hviid, L., Theander, T. G., Hoier-Madsen, M., Bayoumi, R. A., et al. (1993). Anti-phospholipid antibodies in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunology* 79, 653–657.
- Katsetos, G. D., Herman, M. M., and Mörk, S. J. (2003). Class III  $\beta$ -tubulin in human development and cancer. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55, 77–96. doi: 10.1002/cm.10116
- Kenangalem, E., Karyana, M., Burdarm, L., Yeung, S., Simpson, J. A., Tjitra, E., et al. (2016). *Plasmodium vivax* infection: a major determinant of severe anaemia in infancy. *Malar. J.* 15:321. doi: 10.1186/s12936-016-1373-8
- Lacerda, M. V., Mourão, M. P., Coelho, H. C., and Santos, J. B. (2011). Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106(Suppl. 1), 52–63. doi: 10.1590/s0074-02762011000900007
- Lang, B., Newbold, C. I., Williams, G., Peshu, N., Marsh, K., and Newton, C. R. (2005). Antibodies to voltage-gated calcium channels in children with falciparum malaria. *J. Infect. Dis.* 191, 117–121. doi: 10.1086/426512
- Looaeesuwan, S., Merry, A. H., Phillips, R. E., Pleehachinda, R., Wattanagoon, Y., Ho, M., et al. (1987). Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. *Br. J. Haematol.* 67, 473–478. doi: 10.1111/j.1365-2141.1987.tb06171.x
- Ludin, P., Nilsson, D., and Maser, P. (2011). Genome-wide identification of molecular mimicry candidates in parasites. *PLoS One* 6:e17546. doi: 10.1371/journal.pone.0017546
- Ludwig, R. J., Vanhoorelbeke, K., Lepoldt, F., Kaya, Z., Bieber, K., McLachlan, S. M., et al. (2017). Mechanisms of autoantibody-induced pathology. *Front. Immunol.* 8:603. doi: 10.3389/fimmu.2017.00603
- Lutz, H. U., and Bogdanova, A. (2013). Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front. Physiol.* 4:387. doi: 10.3389/fphys.2013.00387
- MacDonald, S. M., Bhisuthiban, J., Shapiro, T. A., Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., et al. (2001). Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10829–10832. doi: 10.1073/pnas.201191498
- Mantel, P., Hoang, A. n., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., et al. (2013). Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe.* 13, 521–534. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.009
- Minoprio, P. (2001). Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int. J. Parasitol.* 31, 583–591. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00171-0
- Molyneux, M. E., Taylor, T. E., Wirima, J. J., and Borgstein, A. (1989). Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: a study of 131 comatose Malawian children. *Q. J. Med.* 71, 441–459.
- Mourão, L. C., Baptista, R. P., Almeida, Z. B., Grynberg, P., Pucci, M. M., Castro-Gomes, T., et al. (2018). Anti-band 3 and anti-spectrin antibodies are increased in *Plasmodium vivax* infection and are associated with anemia. *Sci. Rep.* 6:8762. doi: 10.1038/s41598-018-27109-6
- Mourão, L. C., Roma, P. M., Sultane-Aboobacar, J. S., Medeiros, C. M., de Almeida, Z. B., Fontes, C. J., et al. (2016). Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax* malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. *Malar. J.* 15:397. doi: 10.1186/s12936-016-1449-5
- Moxon, C. A., Gibbins, M. P., McGuinness, D., Milner, D. A., and Marti, M. (2019). New insights into malaria pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* 15. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032640
- Münz, C., Lünemann, J. D., Getts, M. T., and Miller, S. D. (2009). Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat. Rev. Immunol.* 9, 246–258. doi: 10.1038/nri2527
- Nath, R., Raser, K. J., Stafford, D. (1996). Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin I beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.* 319, 683–690. doi: 10.1042/bj3190683
- Neri, S., Pulvirenti, D., Patamia, I., Zoccolo, A., and Castellino, P. (2008). Acute renal failure in *Plasmodium malariae* infection. *Neth. J. Med.* 66, 166–168.
- Nguansangiam, S., Day, N. P. J., Hien, T. T., Mai, N. T. H., Chaisri, U., Riganti, M., et al. (2007). A quantitative ultrastructural study of renal pathology in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop. Med. Int. Health.* 12, 1037–1050. doi: 10.1111/j.1365-3156.2007.01881.x
- Olowu, W. A., and Adelusola, K. A. (2004). Pediatric acute renal failure in southwestern Nigeria. *Kidney Int.* 66, 1541–1548. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00918.x
- Pinto, A., Gillard, S., Moss, F., Whyte, K., Brust, P., Williams, M., et al. (1998). Human autoantibodies specific for the alpha1A calcium channel subunit reduce both P-type and Q-type calcium currents in cerebellar neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8328–8333. doi: 10.1073/PNAS.95.14.8328
- Ritter, K., Kuhlencord, A., Thomssen, R., and Bommer, W. (1993). Prolonged haemolytic anaemia in malaria and autoantibodies against triosephosphate isomerase. *Lancet* 342, 1333–1334. doi: 10.1016/0140-6736(93)92248-r
- Rivera-Correa, J., Conroy, A. L., Opoka, R. O., Batte, A., Namazzi, R., Ouma, B., et al. (2019b). Autoantibody levels are associated with acute kidney injury, anemia and post-discharge morbidity and mortality in Ugandan children with severe malaria. *Sci. Rep.* 9:14840. doi: 10.1038/s41598-019-51426-z
- Rivera-Correa, J., Guthmiller, J. J., Vijay, R., Fernandez-Arias, C., Pardo-Ruge, M. A., Gonzalez, S., et al. (2017). *Plasmodium* DNA-mediated TLR9 activation of T-bet<sup>+</sup> B cells contributes to autoimmune anaemia during malaria. *Nat. Commun.* 8:1282. doi: 10.1038/s41467-017-01476-6
- Rivera-Correa, J., Mackroth, M. S., Jacobs, T., Schulze Zur Wiesch, J., Rolling, T., and Rodriguez, A. (2019a). Atypical memory B-cells are associated with *Plasmodium falciparum* anemia through anti-phosphatidyserine antibodies. *Elife* 8:e48309. doi: 10.7554/eLife.48309
- Rivera-Correa, J., and Rodriguez, A. (2019). Autoimmune anemia in malaria. *Trends Parasitol.* 36, 91–97. doi: 10.1016/j.pt.2019.12.002
- Rosenberg, E. B., Strickland, G. T., Yang, S. L., and Whalen, G. E. (1973). IgM antibodies to red cells and autoimmune anemia in patients with malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22, 146–152. doi: 10.4269/ajtmh.1973.22.146
- Rosenberg, Y. J. (1978). Autoimmune and polyclonal B cell responses during murine malaria. *Nature* 264, 170–172. doi: 10.1038/274170a0
- Seydel, K. B., Milner, D. A., Kamiza, S. B., Molyneux, M. E., and Taylor, T. E. (2006). The distribution and intensity of parasite sequestration in comatose Malawian children. *J. Infect. Dis.* 194, 208–205. doi: 10.1086/505078
- Shimada, T., Fournier, A. E., and Yamagat, K. (2013). Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *Biomed. Res. Int.* 2013:564534. doi: 10.1155/2013/564534
- Sypniewska, P., Duda, J. F., Locatelli, I., Althaus, C. R., Althaus, F., Genton, B. (2017). Clinical and laboratory predictors of death in African children with features of severe malaria: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 15:147. doi: 10.1186/s12916-017-0906-5
- Taylor, T. E., Fu, W. J., Carr, R. A., Whitten, R. O., Mueller, J. S., Fosiko, N. G., et al. (2004). Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat. Med.* 10, 143–145. doi: 10.1038/nm986
- Teasdale, G., and Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. a practical scale. *Lancet* 2, 81–84. doi: 10.1016/s0140-6736(74)91639-0
- Teo, A., Feng, G., Brown, G. V., Beeson, J. G., and Rogerson, S. J. (2016). Functional antibodies and protection against blood-stage malaria. *Trends Parasitol.* 32, 867–898. doi: 10.1016/j.pt.2016.07.003
- Tischfield, M. A., Baris, H. N., Wu, C., Rudolph, G., Van Maldergem, L. H., W., et al. (2010). Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin

- interactions, and axon guidance. *Cell* 140, 74–87. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.011
- van Velthuysen, M. L. F., and Florquin, S. (2000). Glomerulopathy associated with parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 55–66. doi: 10.1128/cmr.13.1.55-66.2000
- Vanderlugt, C. L., and Miller, S. D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 85–95. doi: 10.1038/nri724
- Ventura, A. M. R. S., Fernandes, A. A. M., Zanini, G. M., Pratt-Riccio, L. R., Sequeira, C. G., do Monte, C. R. S., et al. (2018). Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium vivax* malaria in the Pará state, Brazilian Amazon. *Acta Trop.* 181, 122–131. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.01.022
- von Seidlein, L., Olaosebikan, R., Hendriksen, I. C. E., Lee, S. J., Adedoyin, O. T., Agbenyega, T., et al. (2012). Predicting the clinical outcome of severe falciparum malaria in African children: findings from a large randomized trial. *Clin. Infect. Dis.* 54, 1080–1090. doi: 10.1093/cid/cis034
- Ward, P. A., and Kibuka-Musoke, J. W. (1969). Evidence for soluble immune complexes in the pathogenesis of the glomerulonephritis of quartan malaria. *Lancet* 1, 283–285.
- White, N. J. (2018). Anaemia and malaria. *Malar. J.* 17:371. doi: 10.1186/s12936-018-2509-9
- WHO | World Malaria Report (2019). WHO. Available online at: <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019> (accessed on January 02, 2020).
- Wozencraft, A. O., Lloyd, C. M., Staines, N. A., and Griffiths, V. J. (1990). Role of DNA-binding antibodies in kidney pathology associated with murine malaria infections. *Infect Immun.* 58, 2156–2164.

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Mourão, Cardoso-Oliveira and Braga. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### 3.4.2. Parâmetros clínicos, parasitológicos e demográficos dos pacientes infectados por *P. Vivax*

As manifestações clínicas mais relatadas pelos pacientes infectados por *P. vivax* durante o exame médico foram: febre (95,5%), calafrio (92,5%), cefaleia (88,7%), mialgia (96,2%), epigastralgia (83,5%), náusea (68,7%) e vômito (66,25%). A idade média dos pacientes com malária vivax sem anemia foi de 35,8 anos, enquanto para os pacientes anêmicos foi de 34,5 anos. Com relação ao número de episódios prévios de malária, observou-se que os indivíduos não anêmicos relataram, em média, 7,4 episódios anteriores, enquanto a média para pacientes com anemia foi de 4,9 episódios. Quanto à parasitemia, a média de parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue foi de 4186 para os pacientes sem anemia e de 8449 para os pacientes com anemia. (**Tabela 1**).

Com relação aos parâmetros hematológicos, observou-se que os pacientes infectados por *P. vivax*, mas sem anemia, apresentaram níveis médios de hemoglobina de 15,3 g/dL e hematócrito de 45,2%. Os pacientes anêmicos apresentaram concentrações de hemoglobina de 9,2 g/dL e hematócrito de 28,7%. Além disso, a análise do hemograma revelou que os pacientes infectados por *P. vivax* sem anemia apresentaram uma contagem média de plaquetas de 151100 plaquetas/ $\text{mm}^3$  e contagem média de leucócitos de 5707 leucócitos/ $\text{mm}^3$ . Por outro lado, os pacientes com anemia apresentaram contagens médias de plaquetas e leucócitos de 108840 plaquetas/ $\text{mm}^3$  e 5240 leucócitos/ $\text{mm}^3$ , respectivamente. (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Parâmetros hematológicos, parasitológicos e demográficos dos pacientes com infecção patente por *P. vivax*

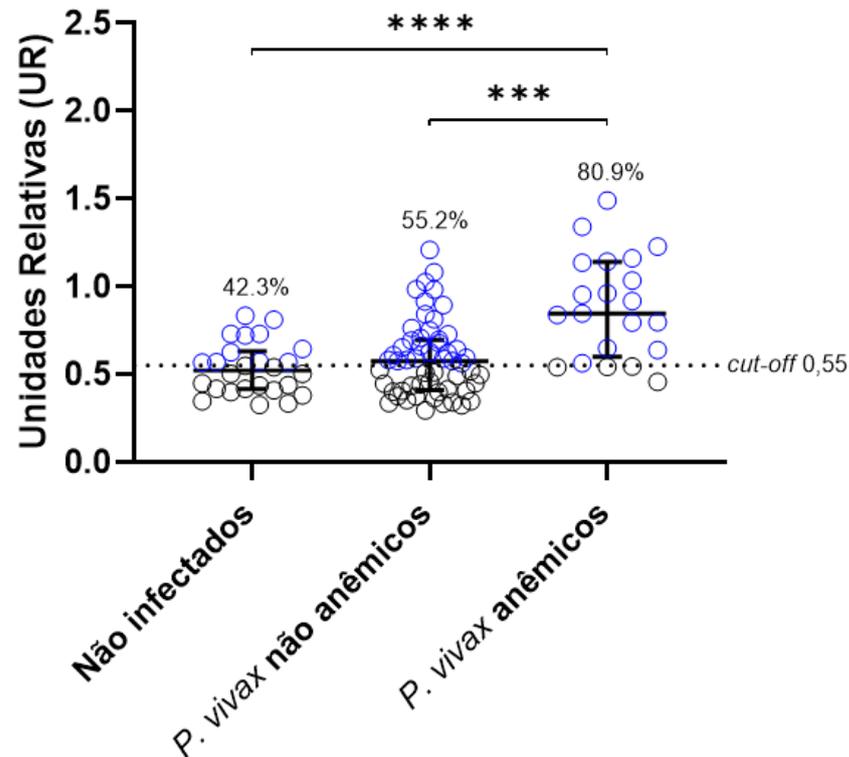
Parâmetros	<i>P. vivax</i> não anêmico	<i>P. vivax</i> anêmico	Valor p
	(Média $\pm$ Desvio Padrão)	(Média $\pm$ Desvio Padrão)	
Idade (anos)	35,8 $\pm$ 15,3	34,5 $\pm$ 13,8	0,7209
Episódios prévios de malária (n°)	7,4 $\pm$ 12	4,9 $\pm$ 10	0,4990
Parasitemia (parasitos/ $\mu\text{L}$ de sangue)	4186 $\pm$ 5432	8449 $\pm$ 11291	0,0162
Hemoglobina (g/dL)	15,2 $\pm$ 1,5	9,2 $\pm$ 1,9	< 0,0001
Hematócrito (%)	45,2 $\pm$ 4,1	28,7 $\pm$ 4,6	< 0,0001
Plaquetas (células/ $\text{mm}^3$ sangue)	151100 $\pm$ 69367	108840 $\pm$ 63936	0,0037
Leucócitos (células/ $\text{mm}^3$ sangue)	5707 $\pm$ 1729	5240 $\pm$ 1760	0,2085

### 3.4.3. Detecção de autoanticorpos IgG no plasma de pacientes infectados por *P. vivax* e correlações com parâmetros hematológicos e parasitológicos

Para avaliar os níveis de autoanticorpos no plasma de pacientes infectados por *P. vivax*, foram utilizados cinco autoantígenos distintos: i) eritrócitos inteiros; ii) *band 3*; iii) PS e iv) DNA. Como controle, foram dosados anticorpos contra a *PvMSP-119*. A detecção dos níveis desses anticorpos foi feita através de ELISA e os resultados estão expressos em unidades relativas (UR). Para a avaliação os plasmas dos indivíduos estudados foram divididos em três grupos: I) Pacientes infectados por *P. vivax* sem anemia; II) Pacientes infectados por *P. vivax* com anemia; e III) Indivíduos não-infectados de área não-endêmica e que nunca foram expostos aos parasitos causadores da malária.

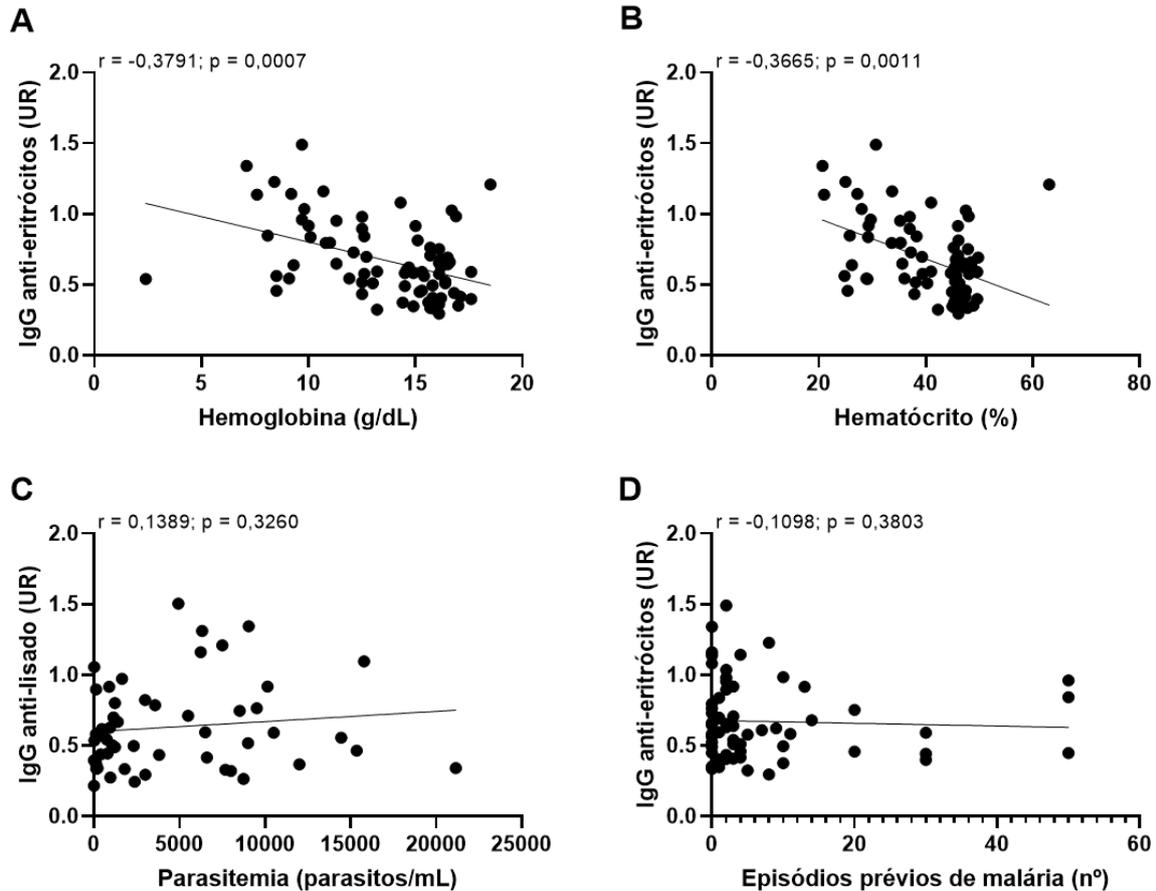
#### 3.4.3.1. IgG anti-eritrócitos

Foi possível observar diferença significativa à resposta de anticorpos no plasma de indivíduos anêmicos infectados por *P. vivax* (0,84 [0,60-1,14]) em relação aos infectados não-anêmicos (0,57 [0,40-0,69];  $p = 0,0003$ ) e aos indivíduos não-infectados (0,52 [0,41-0,63];  $p < 0,0001$ ) (**Figura 5**). Não foi encontrada diferença significativa entre os indivíduos infectados sem anemia e os que nunca foram expostos aos parasitos causadores da malária.



**Figura 5 – Anticorpos IgG anti-eritrócitos detectados nos plasmas dos indivíduos estudados.** A resposta de IgG anti-eritrócitos inteiros foi expressa como unidades relativas (UR). A linha central representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). A linha pontilhada indica o valor de *cut-off*. Os indivíduos sinalizados em azul são aqueles que se encontram acima do valor de *cut-off*. As porcentagens acima de cada grupo indicam a frequência de respondedores acima do valor de *cut-off*. Não infectados (n = 26), *P. vivax* não anêmicos (n = 56), *P. vivax* anêmicos (n = 21). Acessou-se a Significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e está representada por asteriscos (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

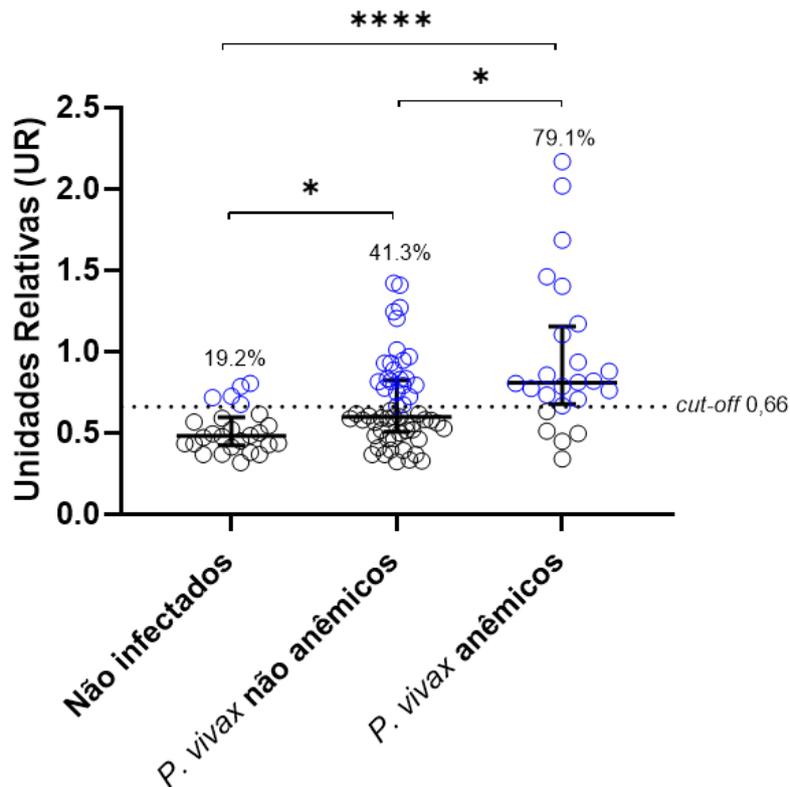
Com relação às correlações com os parâmetros hematológicos, ambas as respostas de autoanticorpos também tiveram resultados similares. Observou-se a correlação significativa negativa com níveis de hemoglobina ([r = -0,3791; p = 0,0007]; [r = -0,3661; p = 0,0029]) e com o hematócrito ([r = -0,3665; p = 0,0011]; [r = -0,3802; p = 0,0019]) (**Figura 6A,B**). Com relação aos outros parâmetros avaliados, não houve correlação significativa para ambas as metodologias utilizadas (**Figura 6C,D**).



**Figura 6 - Correlação entre a resposta de IgG anti-eritrócitos e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por *P. vivax*.** A) nível de hemoglobina, B) hematócrito, C) parasitemia e D) episódios prévios de malária. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.4.3.2. IgG anti-band 3

A detecção da resposta de IgG à proteína *band 3* no plasma de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* (mediana: 0,81 [intervalo interquartil]: 0,67-1,15) foi significativamente elevada quando comparada à resposta de pacientes infectados não-anêmicos (0,59 [0,50-0,82]) ( $p = 0,0252$ ) e indivíduos não-infectados (0,47 [0,42-0,59]) ( $p < 0,0001$ ). Esse aumento significativo também foi observado quando comparamos indivíduos infectados sem anemia com indivíduos não-infectados ( $p = 0,0127$ ) (**Figura 7**).



**Figura 7 – Resposta de IgG detectada nos indivíduos dos grupos estudados frente à proteína *band 3*.** A resposta de IgG anti-*band 3* foi expressa como unidades relativas (UR). A linha central representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). A linha pontilhada indica o valor de *cut-off*. Os indivíduos sinalizados em azul são aqueles que se encontram acima do valor de *cut-off*. As porcentagens acima de cada grupo indicam a frequência de respondedores acima do valor de *cut-off*. Não infectados (n = 26), *P. vivax* não anêmicos (n = 57), *P. vivax* anêmicos (n = 24). Significância estatística foi acessada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e está representada por asteriscos (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

Quando correlacionado com os parâmetros hematológicos e parasitológicos, verificou-se correlação significativa e inversamente proporcional da resposta anti-*band 3* com hemoglobina ( $r = -0,3567$ ;  $p = 0,0035$ ) e com hematócrito ( $r = -0,3575$ ;  $p = 0,0035$ ) (Figura 8A,B). Não foi observada correlação significativa com parasitemia e exposição prévia à malária (Figura 8C,D).

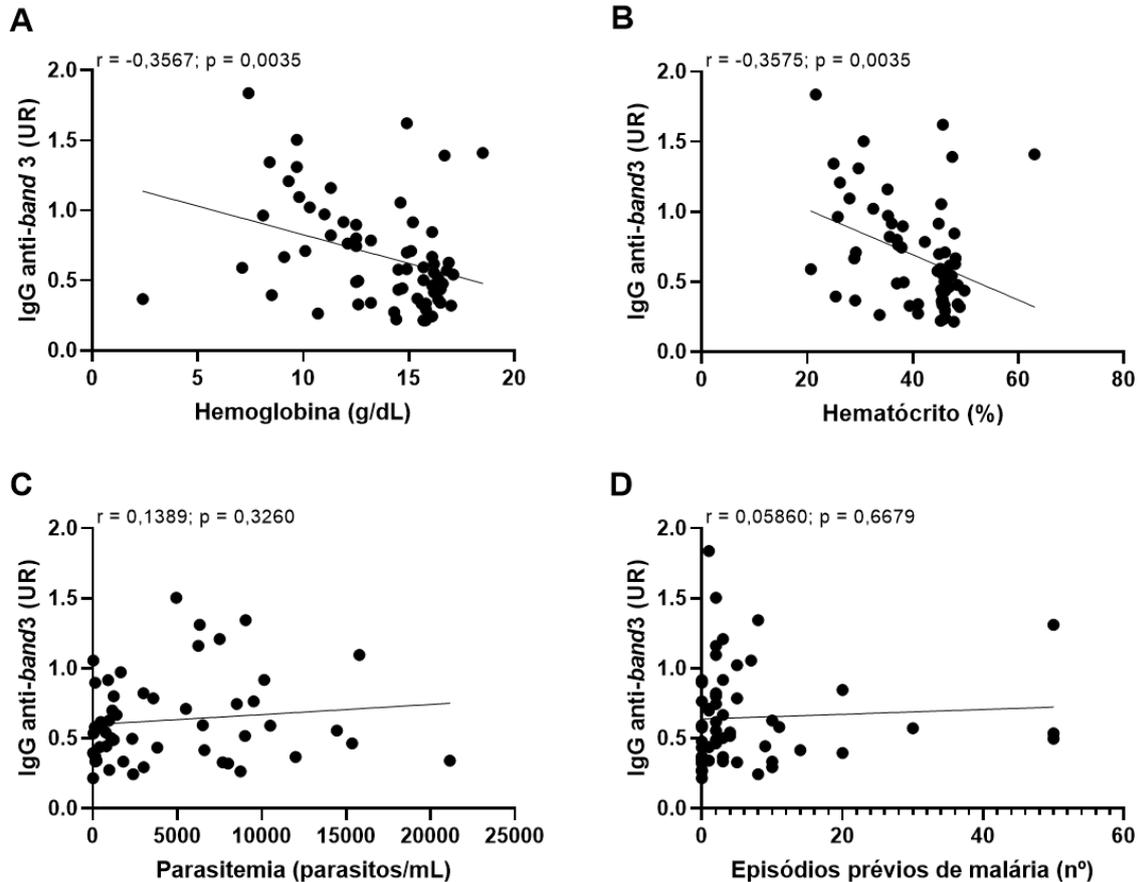
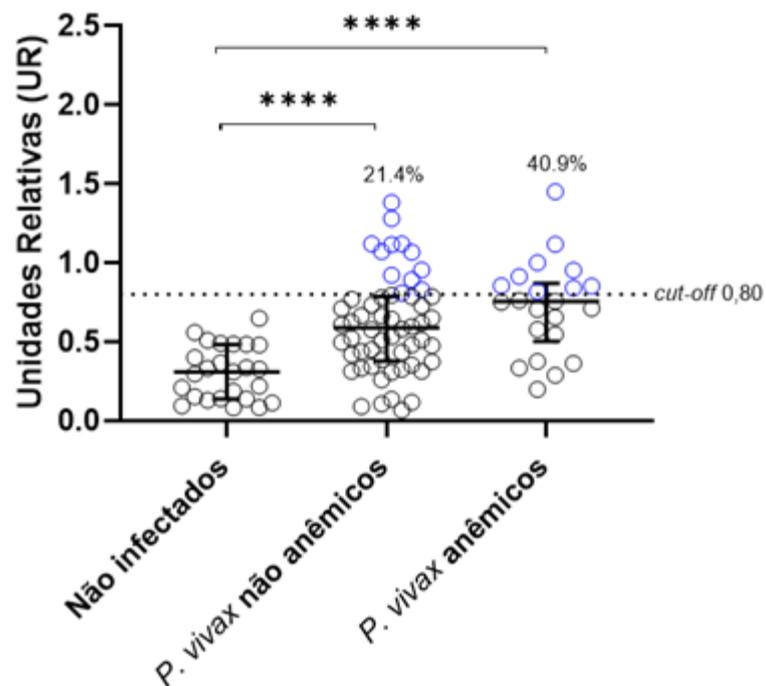


Figura 8 – Correlação entre a resposta de IgG anti-band 3 e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por *P. vivax*. A) nível de hemoglobina, B) hematócrito, C) parasitemia e D) episódios prévios de malária. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

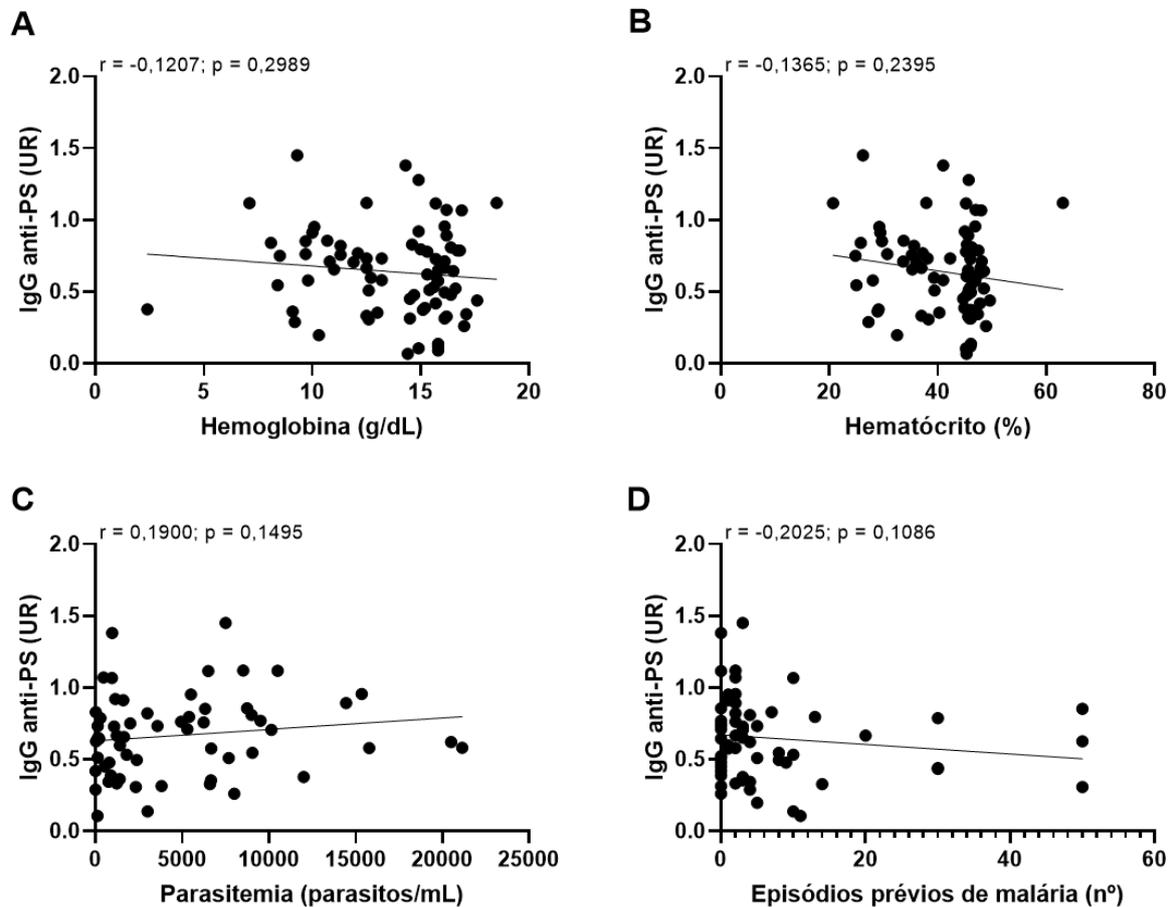
### 3.4.3.3. IgG anti-PS

Verificou-se que a resposta de IgG anti-PS, no plasma de pacientes infectados com (0,75 [0,55-0,85]) e sem (0,58 [0,37-0,78]) anemia, é significativamente maior do que em indivíduos não-infectados (0,31 [0,13-0,48]) ( $p < 0,0001$  para ambos). No entanto, não foi observada diferença significativa entre a resposta anti-PS entre pacientes anêmicos e não anêmicos ( $p = 0,3493$ ). (Figura 9).



**Figura 9 – Resposta anti-PS detectada no plasma dos indivíduos dos grupos estudados.** A resposta de IgG anti-PS foi expressa como unidades relativas (UR). A linha central representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). A linha pontilhada indica o valor de *cut-off*. Os indivíduos sinalizados em azul são aqueles que se encontram acima do valor de *cut-off*. As porcentagens acima de cada grupo indicam a frequência de respondedores acima do valor de *cut-off*. Não infectados (n = 25), *P. vivax* não anêmicos (n = 56), *P. vivax* anêmicos (n = 22). Significância estatística foi acessada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e está representada por asteriscos (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

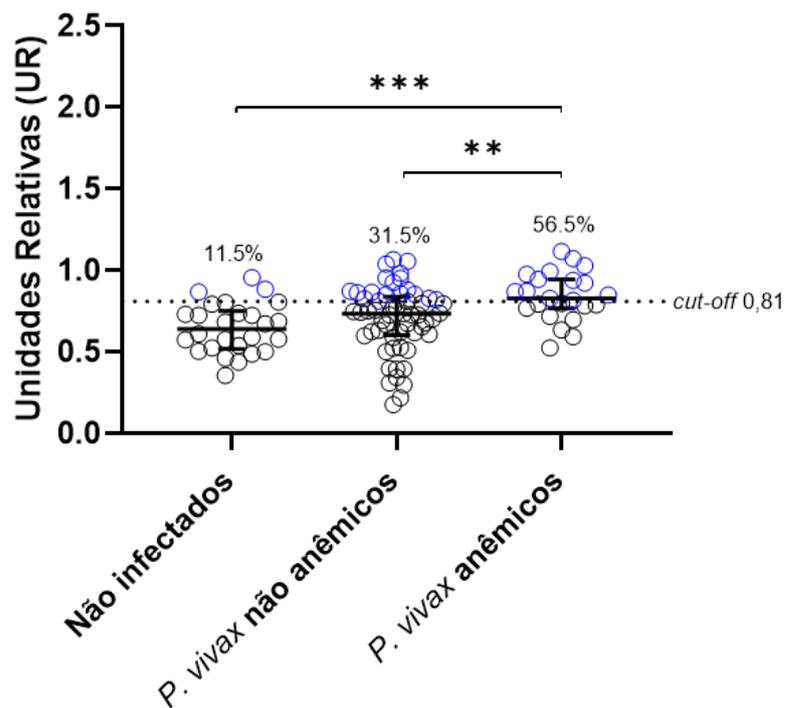
Embora encontrada diferença significativa entre indivíduos infectados e não infectados, a resposta de IgG anti-PS não se correlacionou com nenhum parâmetro parasitológico ou hematológico (**Figura 10**).



**Figura 10** - Correlação entre a resposta de IgG anti-PS e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por *P. vivax*. **A)** nível de hemoglobina, **B)** hematócrito, **C)** parasitemia e **D)** episódios prévios de malária. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

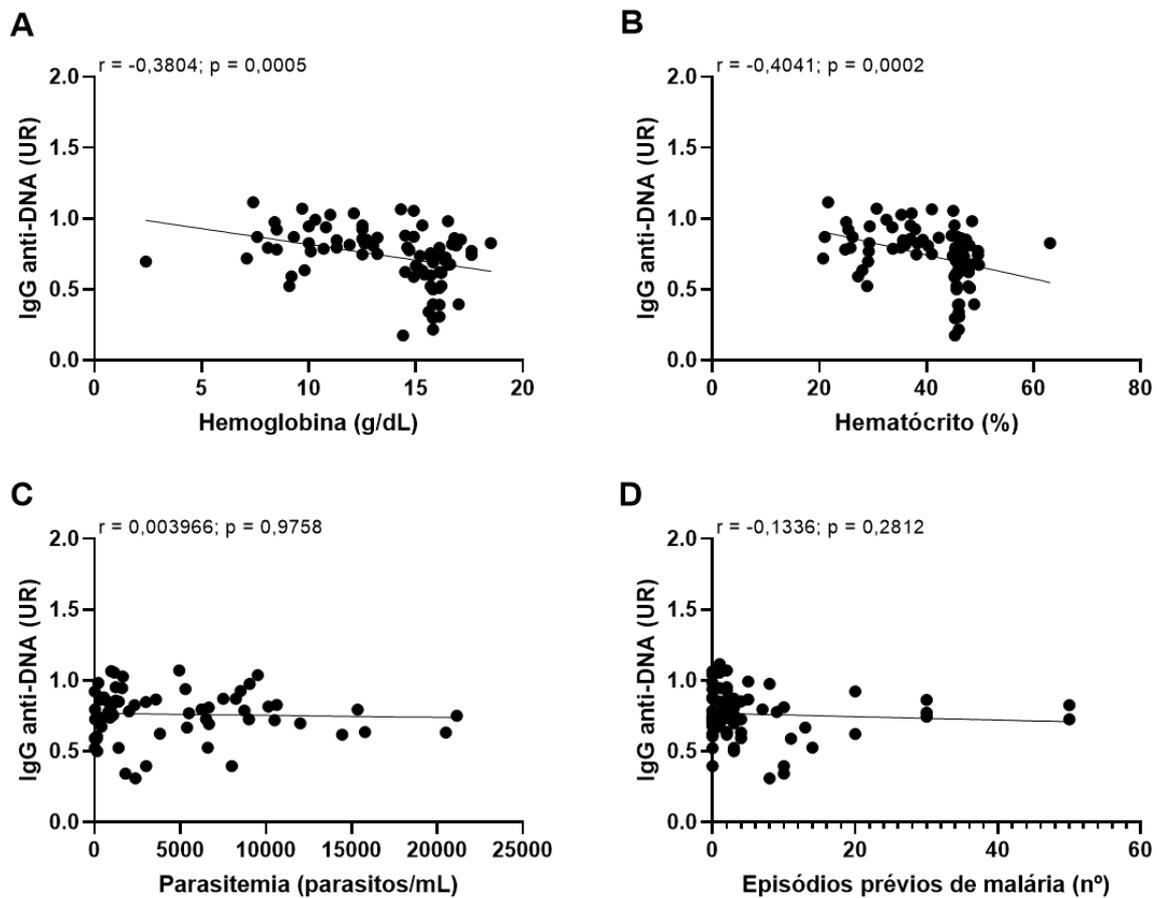
#### 3.4.3.4. IgG anti-DNA

Assim como a resposta de anticorpos anti-*band 3*, a resposta de IgG anti-DNA também foi significativamente maior em pacientes infectados e com anemia (0,82 [0,76-0,95]) em relação aos infectados não anêmicos (0,73 [0,60-0,84]) ( $p = 0,0065$ ) e os não-infectados (0,64 [0,51-0,75]) ( $p = 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre a resposta anti-DNA daqueles indivíduos infectados por *P. vivax* e sem anemia dos indivíduos não infectados (**Figura 11**).



**Figura 11 – Níveis de IgG anti-DNA nos indivíduos dos grupos estudados.** A resposta de IgG anti-DNA foi expressa como unidades relativas (UR). A linha central representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). A linha pontilhada indica o valor de *cut-off*. Os indivíduos sinalizados em azul são aqueles que se encontram acima do valor de *cut-off*. As porcentagens acima de cada grupo indicam a frequência de respondedores acima do valor de *cut-off*. Não infectados (n = 26), *P. vivax* não anêmicos (n = 57), *P. vivax* anêmicos (n = 23). Significância estatística foi acessada pelo teste de *One Way ANOVA*, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey e está representada por asteriscos (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

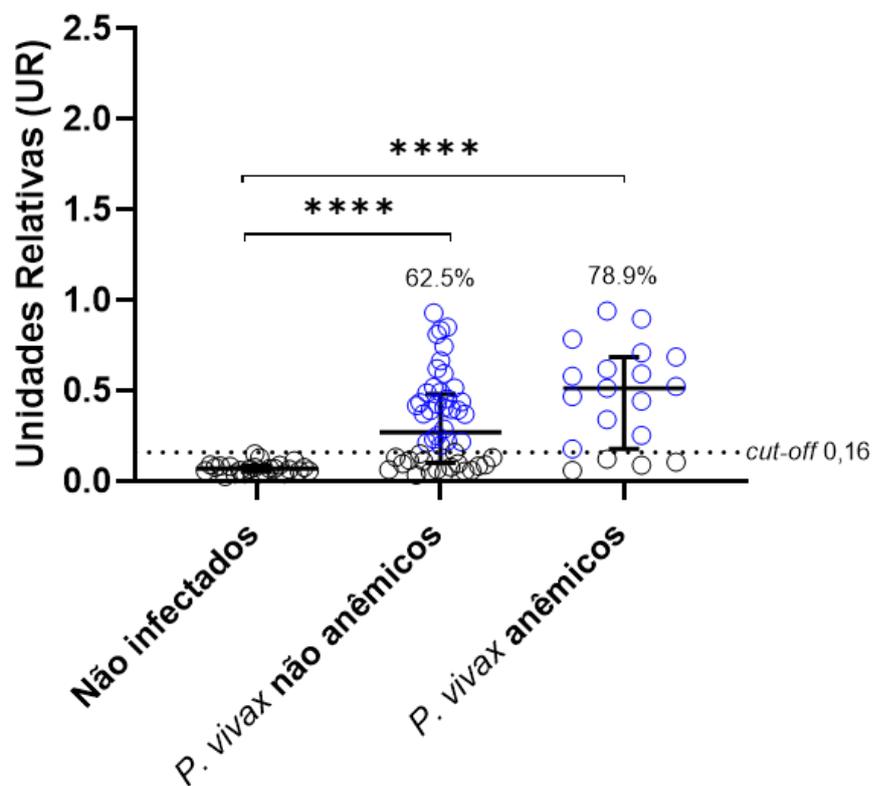
A resposta anti-DNA também apresentou semelhanças à resposta anti-*band 3* no que concerne às correlações observadas. Os níveis destes autoanticorpos foram significativamente correlacionados de forma inversa aos níveis de hemoglobina ( $r = -0,3804$ ;  $p = 0,0005$ ) e com o hematócrito ( $r = -0,4041$ ;  $p = 0,0002$ ) (Figura 12A,B). Quanto aos outros parâmetros avaliados, não foi observada nenhuma correlação significativa (Figura 12C,D).



**Figura 12 - Correlação entre a resposta de IgG anti-DNA e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por *P. vivax*.** A) nível de hemoglobina, B) hematócrito, C) parasitemia e D) episódios prévios de malária. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

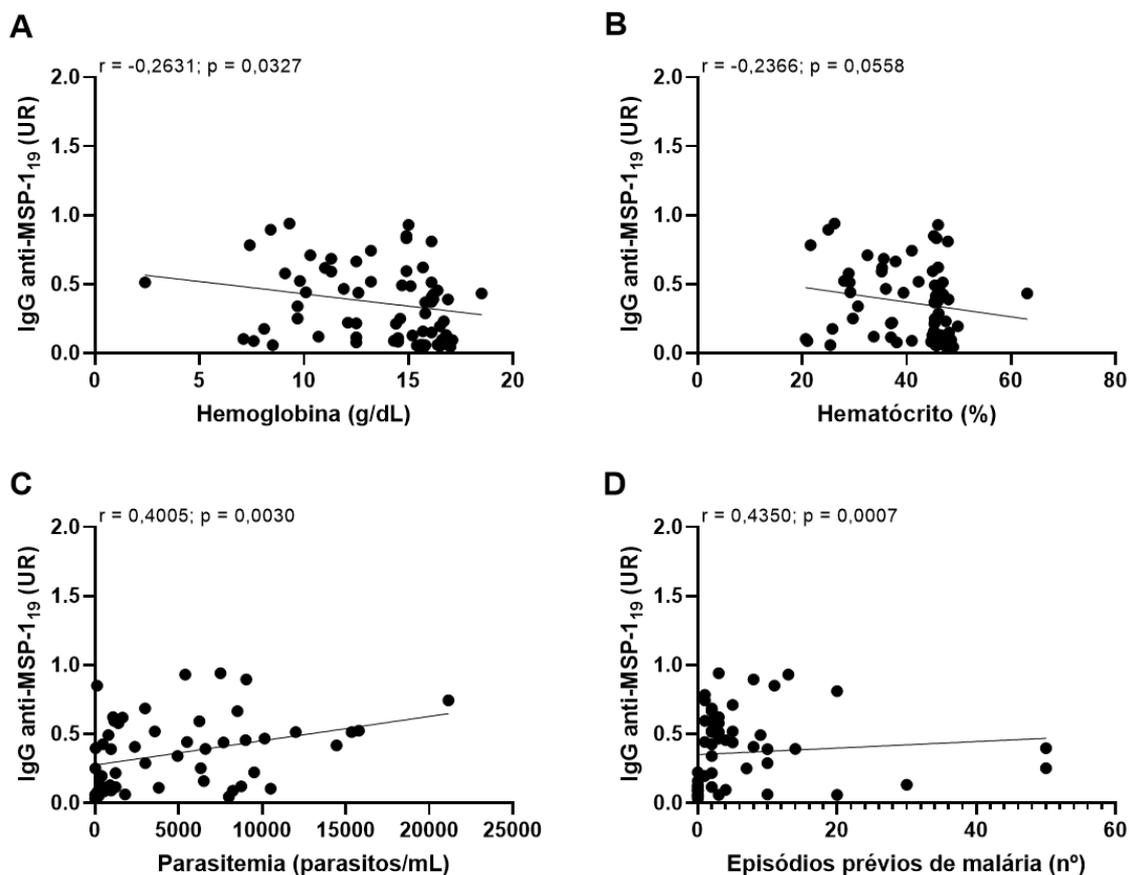
### 3.4.3.5. IgG anti-*Pv*MSP-1<sub>19</sub>

Utilizamos, como controle de resposta anti-parasitária, a proteína recombinante *Pv*MSP-1<sub>19</sub>. A detecção de IgG anti-*Pv*MSP-1<sub>19</sub> mostrou que ambos os grupos de pacientes infectados (anêmico (0,51 [0,17-0,68]) e não-anêmicos (0,26 [0,10-0,47])) apresentaram níveis desses anticorpos significativamente aumentados em relação aos indivíduos não infectados (0,06 [0,05-0,08]) ( $p < 0,0001$  para ambos) (**Figura 13**). Não houve diferença estatística significativa quando comparamos pacientes infectados por *P. vivax* com e sem anemia.



**Figura 13 – Níveis de anticorpos anti-*Pv*MSP-1<sub>19</sub> nos plasmas dos grupos estudados.** A resposta de IgG anti-*Pv*MSP-1<sub>19</sub> foi expressa como unidades relativas (UR). A linha central representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). A linha pontilhada indica o valor de *cut-off*. Os indivíduos sinalizados em azul são aqueles que se encontram acima do valor de *cut-off*. As porcentagens acima de cada grupo indicam a frequência de respondedores acima do valor de *cut-off*. Não infectados (n = 24), *P. vivax* não anêmicos (n = 48), *P. vivax* anêmicos (n = 19). Significância estatística foi acessada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e está representada por asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Observou-se a correlação significativa e positiva da resposta anti-PvMSP-119 com parâmetros parasitológicos como a parasitemia ( $r = 0,4005$ ;  $p = 0,0030$ ) e a exposição prévia à *Plasmodium* spp ( $r = 0,4350$ ;  $p = 0,0007$ ) (Figura 14C,D). Foi constatada, também, uma correlação significativa, porém inversamente proporcional, com os níveis de hemoglobina ( $r = -0,2631$ ;  $p = 0,0327$ ) (Figura 14A), no entanto, nenhuma relação foi encontrada com o hematócrito.

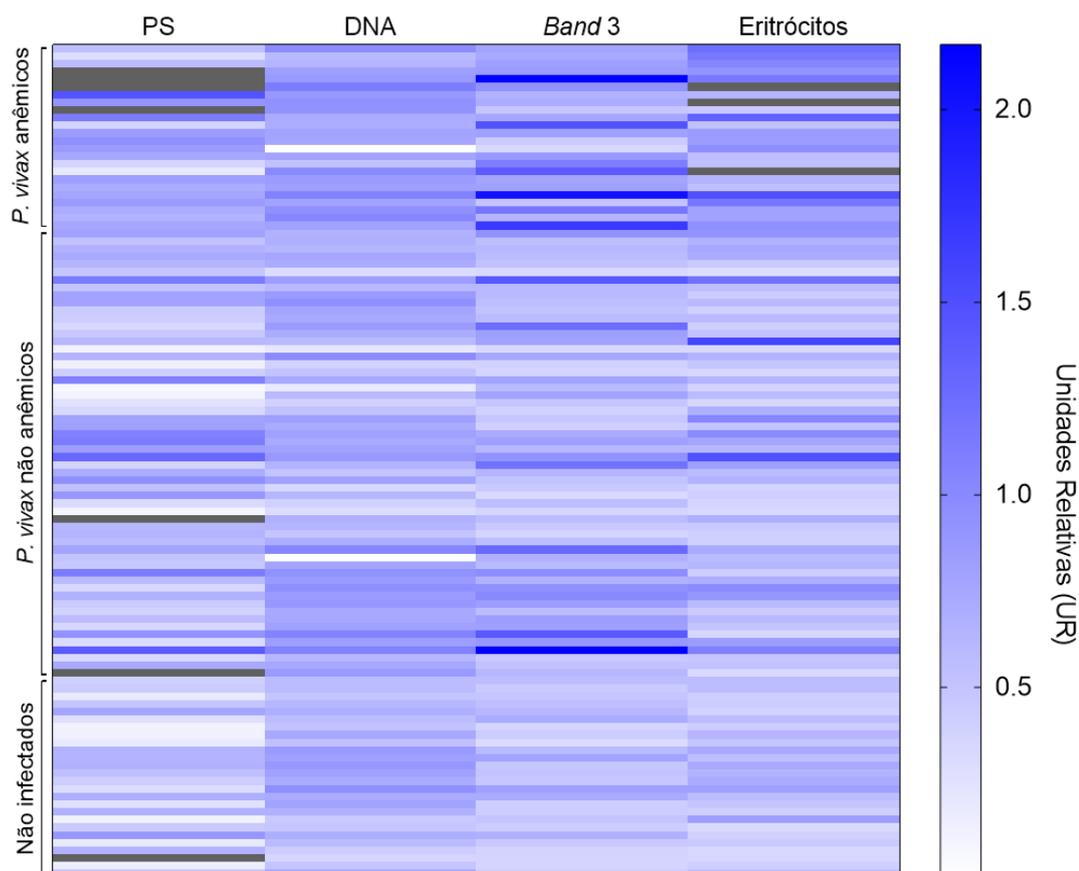


**Figura 14 - Correlação entre a resposta de IgG anti-PvMSP-119 e parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por *P. vivax*.** A) nível de hemoglobina, B) hematócrito, C) parasitemia e D) episódios prévios de malária. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.4.4. Dinâmica correlacional dos autoanticorpos durante infecções por *P. vivax*

#### 3.4.4.1. Correlações diretas entre os antígenos avaliados

A fim de entender melhor o perfil da resposta destes autoanticorpos entre os diferentes grupos estados, um *heatmap* foi construído com os valores da resposta para cada autoantígeno (**Figura 15**). Os valores foram distribuídos em um gradiente de azul, no qual o mais próximo de 0, mais clara é a cor representada no mapa e quanto mais próximo ou acima de 3, mais escura a tonalidade de azul utilizada. Os valores em cinza representam amostras que não foram testadas para aquele antígeno. Neste gráfico, é possível observar, individualmente, que os pacientes anêmicos com malária vivax têm resposta elevada aos antígenos estritamente associados com eritrócitos, principalmente anti-*band 3*, enquanto a resposta frente aos outros autoantígenos é menos acentuada.



**Figura 15** – *Heatmap* representativo da resposta de cada indivíduo para cada autoantígeno avaliado. A escala de cores (ao lado) representa os valores de unidades relativas (UR) utilizados para construir o gráfico. Os valores marcados em cinza indicam os plasmas que não foram testados para o respectivo antígeno.

### 3.4.4.2. Análise de Componentes Principais com parâmetros relacionados à infecção por *P. vivax*

Como a resposta imune humoral envolve uma atuação simultânea de uma série de anticorpos que agem em diferentes alvos, realizou-se uma PCA com os dados referentes às respostas frente aos diferentes antígenos avaliados, objetivando-se avaliar, simultaneamente, os efeitos de todos os autoanticorpos em uma única análise, uma vez que isso reflete melhor a situação biológica. Para esta análise, utilizaram-se apenas aqueles indivíduos que possuíam dados para todos os antígenos avaliados, portanto, foram avaliados 46 pacientes com infecção por *P. vivax* e sem anemia, 16 pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* e 23 indivíduos não infectados. Os resultados da PCA mostraram que os quatro primeiros componentes principais (CP) explicam 91,5% da variação total dos dados (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – *Eigenvalues* e percentual de inércia explicado por cada CP da PCA realizada para todos os antígenos testados.

Componente principal	$\lambda_i$ ( <i>eigenvalue</i> )	Inércia individual (%)	Inércia acumulada (%)
1	1,5712	49,3	49,3
2	0,9372	17,5	66,9
3	0,8378	14,0	80,9
4	0,1404	10,7	91,6

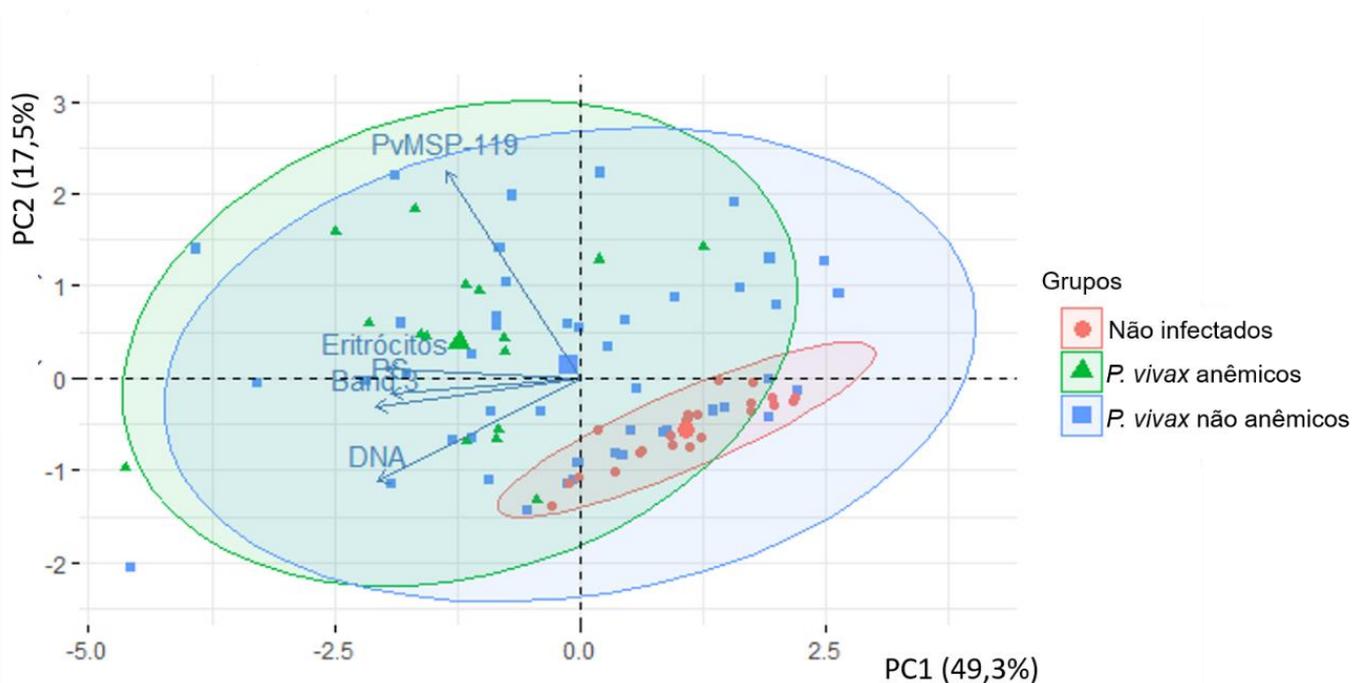
O primeiro componente contribuiu com 48,8% da variabilidade e deu peso semelhante para IgG anti-*band* 3, anti-PS, anti-DNA e anti-eritrócitos, ao passo que o CP2 foi melhor representado por IgG anti-MSP-1<sub>19</sub>, contribuindo com 17,5% da variação observada. IgG anti-PS exerceu um peso maior no CP3, contribuindo para 14% da variabilidade dos dados, enquanto que o CP4 deu um peso maior para IgG anti-eritrócitos e contribuiu com 10,7% da variância dos dados (**Tabela 3**).

**Tabela 3** – Variáveis incluídas na PCA e sua contribuição para os dois eixos derivados

Variáveis	Correlação das variáveis com os componentes			
	<i>(Loadings)*</i>			
	CP1	CP2	CP3	CP4
IgG anti- <i>band 3</i>	<b>-0,490</b>	-0,120	-0,394	0,565
IgG anti-PS	-0,452	-0,065	<b>0,727</b>	-0,287
IgG anti-DNA	-0,483	-0,440	0,160	0,239
IgG anti-eritrócitos	-0,465	0,035	-0,528	<b>-0,706</b>
IgG anti-MSP-1 <sub>19</sub>	-0,322	<b>0,886</b>	0,101	0,203

\*o maior *loading* de cada CP está representado em negrito.

Com base nos dados obtidos pela PCA, podemos inferir que a resposta associada a CP1 está associada à ausência ou presença de resposta aos antígenos testados. A resposta ao CP2 parece estar associada positivamente à resposta específica anti-parasitária. Para a resposta ao CP3, esta parece estar associada à resposta associada à inflamação e ao processo infeccioso. Uma resposta mais associada a antígenos eritrocitários juntamente à presença do parasito parece estar associada ao CP4. Desta forma, a PCA indicou uma segregação gradual dos grupos estudados em direção aos *loadings* representativos dos antígenos avaliados, com os pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* mais próximos destas variáveis, enquanto os indivíduos não infectados ficaram na direção oposta a estes *loadings* (**Figura 16**).

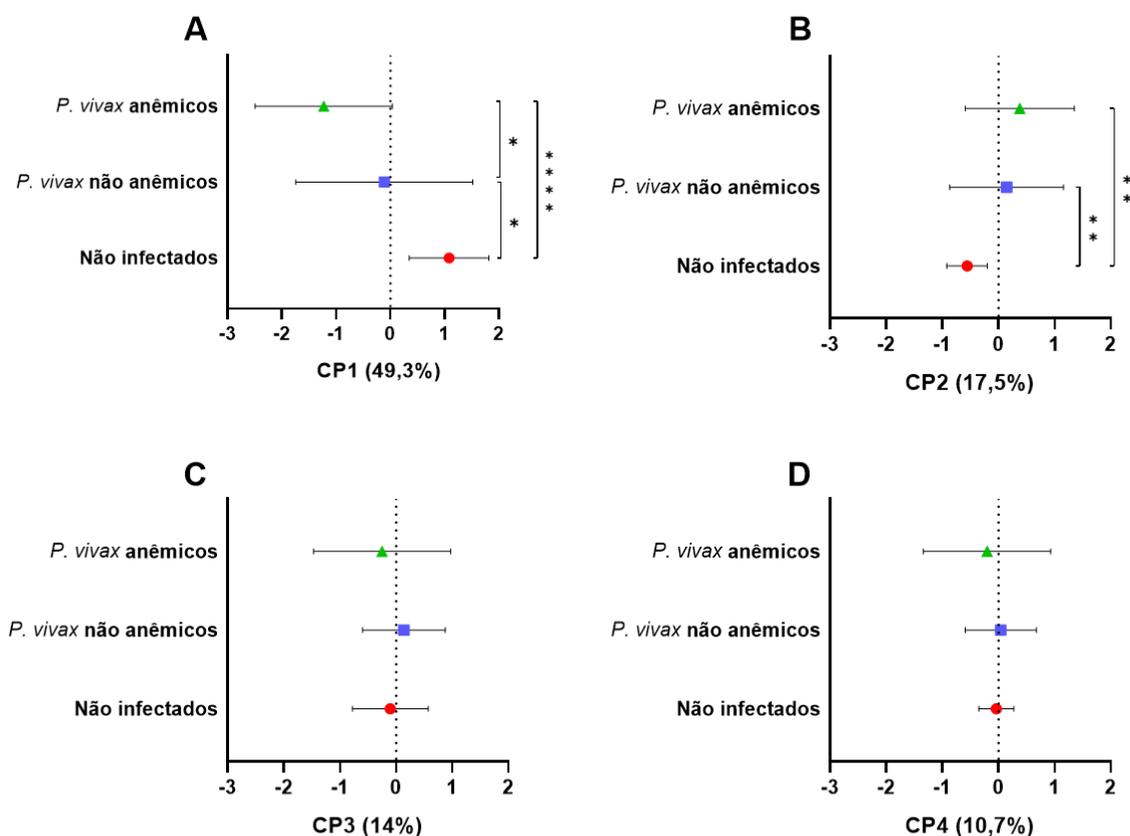


**Figura 16 – PCA da reação aos autoantígenos em infecções por *P. vivax* e em indivíduos saudáveis.** Representação dos dois primeiros componentes principais com 48,8% e 17,5% das variâncias explicadas (66,4% cumulativa explicada). O tamanho do símbolo é proporcional à contribuição individual aos CPs. As coordenadas dos *loadings* para cada antígeno avaliado estão representadas pelas setas.

Os padrões de resposta contra os antígenos estudados foram, dessa forma, comparados entre si (**Figura 17**) e relacionados com os parâmetros associados à infecção por *P. vivax* com a parasitemia e exposição prévia à malária (**Figura 18**). Verificou-se que a média (média±desvio padrão) dos *scores* dos pacientes infectados por *P. vivax* com e sem anemia se correlacionaram negativamente com o CP1 ( $-1,23 \pm 1,26$  e  $-0,11 \pm 1,63$ , respectivamente) e se diferenciaram estatisticamente da média dos *scores* dos indivíduos não infectados ( $1,08 \pm 0,73$ ) ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,003$ , respectivamente). Além disso, houve também uma diferença significativa nos *scores* entre os dois grupos de pacientes infectados ( $p = 0,0177$ ) (**Figura 17A**). Para o CP2, pode-se constatar que a média dos *scores* dos indivíduos infectados se correlacionaram positivamente com este componente ( $0,38 \pm 0,96$  e  $0,14 \pm 1,0$ , respectivamente), ao passo que os dados dos indivíduos, sem infecção, correlacionaram-se negativamente ( $-0,55 \pm 0,36$ ). Neste caso, as diferenças significativas observadas foram apenas dos grupos de pacientes infectados em relação aos indivíduos não infectados ( $p = 0,0043$  e  $p = 0,0067$ , respectivamente) (**Figura 17B**).

Acerca da média dos grupos estudados para o CP3, verificou-se que os pacientes anêmicos com malária vivax ( $-0,25 \pm 1,22$ ) e os indivíduos não infectados ( $-0,1 \pm 0,67$ ) apresentaram correlação negativa com este componente, ao passo que os pacientes

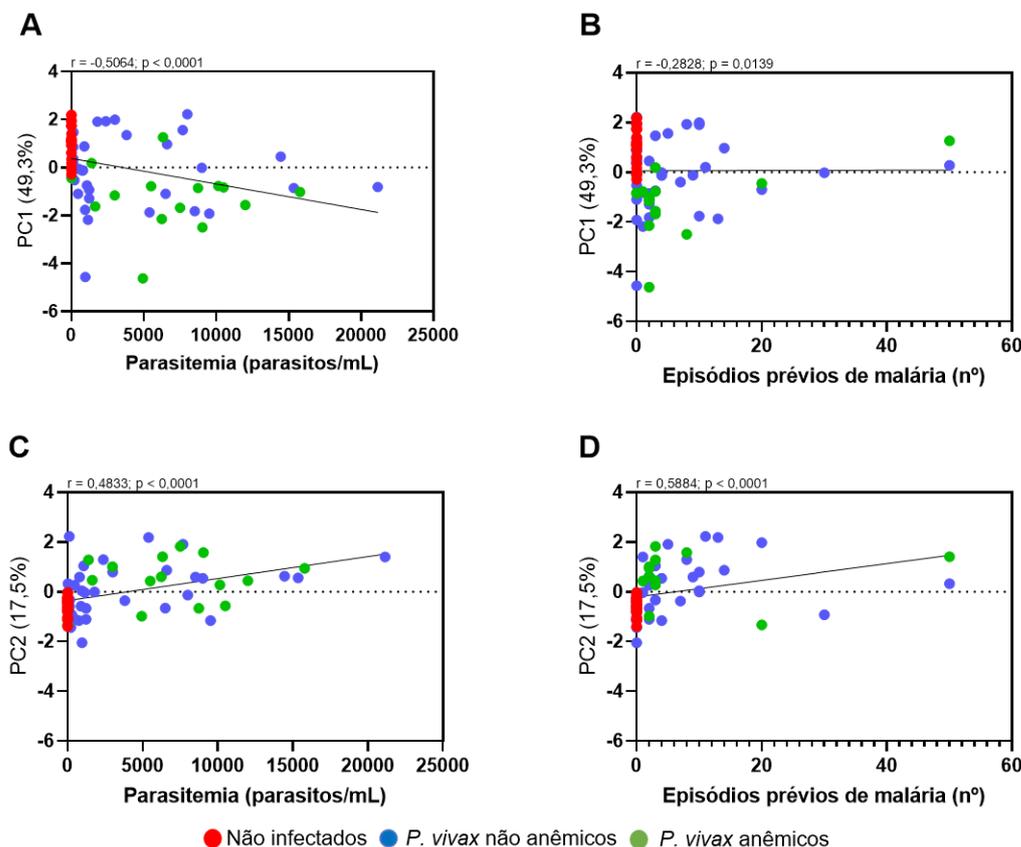
infectados, mas sem anemia tiveram seus scores correlacionados positivamente com o CP3 ( $0,13 \pm 0,73$ ). No entanto, não houve diferença estatística significativa entre nenhum grupo avaliado (**Figura 17C**). O mesmo padrão se repetiu para o CP4, no qual os pacientes com anemia ( $-0,20 \pm 1,13$ ) e as pessoas sem infecção ( $-0,03 \pm 0,31$ ) tiveram a média de seus scores correlacionadas negativamente, enquanto que a média dos scores dos pacientes não anêmicos ( $0,04 \pm 0,63$ ) se correlacionou positivamente com este componente. Também não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os três grupos (**Figura 17D**).



**Figura 17 – Média  $\pm$  desvio padrão dos scores referentes aos quatro primeiros CPs. A) CP1, B) CP2, C) CP3 e D) CP4. Os símbolos coloridos indicam a média e as barras flutuantes indicam o desvio padrão de cada grupo. A significância estatística foi acessada pelo teste de *One Way ANOVA*, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey e está representada por asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).**

Os scores do CP1 se correlacionaram negativamente com a parasitemia ( $r = -0,5064$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 18A**) e com a exposição prévia à malária ( $r = -0,2828$ ;  $p = 0,0139$ ) (**Figura 18B**), indicando que a presença de todos os anticorpos testados está correlacionada com a presença de *P. vivax* e à exposição a este parasito. Por outro lado, os scores do CP2 se correlacionaram de forma positiva com a parasitemia ( $r = 0,4833$ ;  $p$

< 0,0001) (**Figura 18C**) e com os episódios prévios de malária ( $r = 0,5884$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 18D**), indicando que IgG anti-*Pv*MSP-1<sub>19</sub> está positivamente correlacionado ao aumento do número de parasitos na corrente sanguínea dos pacientes infectados e também à exposição destes à infecção. Não houve correlações significativas entre os *scores* do CP3 e CP4 com os parâmetros indicativos de infecção por *P. vivax*.



**Figura 18 – Correlações entre os *scores* do CP1 e CP2 e os parâmetros indicativos de infecção.** A) CP1 e parasitemia, B) CP1 e episódios prévios de malária, C) CP2 e parasitemia, D) CP2 e episódios prévios de malária. Os diferentes grupos estão representados com diferentes cores de acordo com a legenda. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.4.4.3. Análise de Componentes Principais e parâmetros hematológicos dos pacientes infectados por *P. vivax*

Objetivando correlacionar a resposta aos autoantígenos com os parâmetros hematológicos realizou-se um PCA com os autoantígenos, no entanto, foram utilizados apenas os dados dos indivíduos infectados por *P. vivax* uma vez que, infelizmente, não temos os dados hematológicos dos indivíduos não infectados. O resultado de PCA

mostrou que os quatro primeiros componentes principais representaram 92,2% da variância dos dados (**Tabela 4**)

**Tabela 4** – *Eigenvalues* e percentual de inércia explicado por cada CP da PCA realizada para a resposta aos antígenos testados entre os pacientes com infecção por *P. vivax*

Componente principal	$\lambda_i$ ( <i>eigenvalue</i> )	Inércia individual (%)	Inércia acumulada (%)
1	1,5210	46,2	46,2
2	0,9739	18,9	65,2
3	0,8639	14,9	80,2
4	0,7758	12	92,2

O primeiro componente contribuiu com 46,2% da variabilidade e deu peso maior para IgG anti-DNA, seguido de IgG anti-*band* 3, IgG anti-eritrócitos e IgG anti-PS, respectivamente. O CP2 foi melhor representado por IgG anti-MSP-1<sub>19</sub>, contribuindo com 18,9% da variação dos dados observada. IgG anti-PS exerceu um peso maior no CP3, contribuindo para 14,9% da variabilidade dos dados, enquanto que o CP4 deu um peso maior para IgG anti-eritrócitos e contribuiu com 12% da variância dos dados (**Tabela 5**).

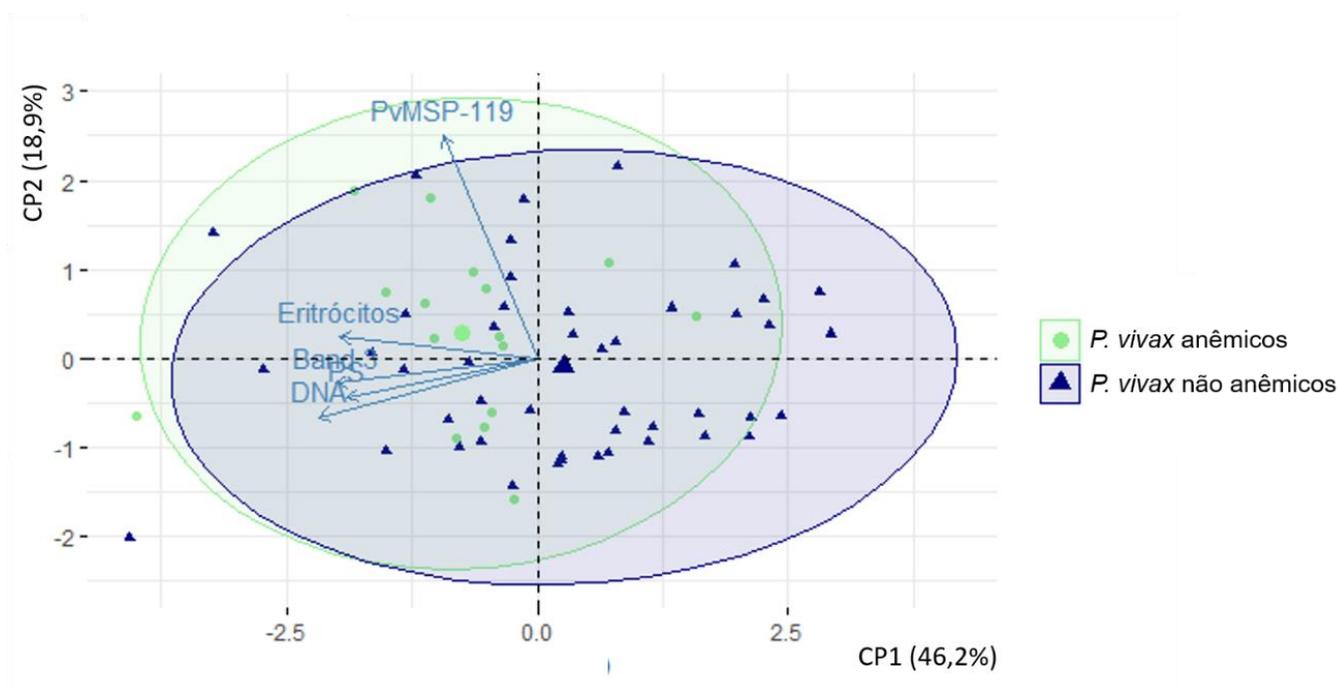
**Tabela 5** – Variáveis incluídas na PCA e sua contribuição para os dois eixos derivados

Variáveis	Correlação das variáveis com os componentes ( <i>Loadings</i> )*			
	CP1	CP2	CP3	CP4
IgG anti- <i>band</i> 3	-0,485	-0,105	-0,573	-0,399
IgG anti-PS	-0,458	-0,161	<b>0,720</b>	0,166
IgG anti-DNA	<b>-0,526</b>	-0,248	0,148	-0,399
IgG anti-eritrócitos	-0,475	0,092	-0,336	<b>0,783</b>
IgG anti-MSP-1 <sub>19</sub>	-0,224	<b>0,944</b>	0,130	-0,197

\*o maior *loading* de cada CP está representado em negrito.

Com base nestes dados, foi possível concluir que o CP1 é representado pela resposta contra os antígenos testados, tendo correlações negativas mais intensas pros autoantígenos do que para o antígeno específico de *P. vivax*. Com o CP2, podemos distinguir a resposta específica anti-parasitária e as respostas autoimunes investigadas.

Os *loadings* do CP3 podem indicar uma associação ao processo inflamatório decorrente da malária *vivax*. Para o CP4, a resposta parece estar associada ao estresse dos eritrócitos. Os resultados são similares à PCA realizada com os parâmetros parasitológicos, no entanto, não houve uma segregação gradual tão aparente dos dois grupos de pacientes infectados. Contudo, o grupo de pacientes anêmicos estão mais agrupados ao lado dos *loadings* de resposta autoimune, enquanto os pacientes não anêmicos estão dispersos e mais concentrados ao lado oposto destes *loadings* (**Figura 19**).

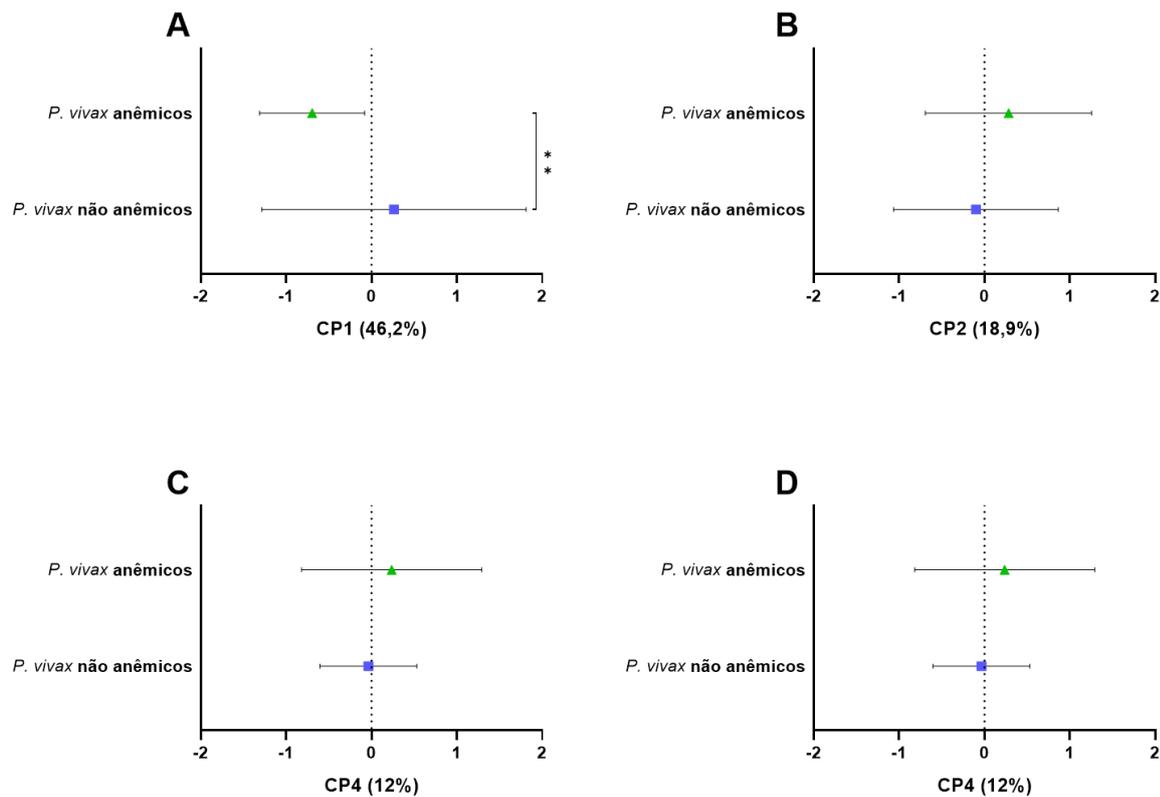


**Figura 19** – PCA dos antígenos avaliados entre os indivíduos com infecção patente por *P. vivax*. Representação dos dois primeiros componentes principais com 46,2% e 18,9% das variâncias explicadas (65,2% cumulativa explicada). O tamanho do símbolo é proporcional à contribuição individual aos CPs. As coordenadas dos *loadings*, para cada antígeno avaliado, estão representadas pelas setas.

Os *scores* para cara CP foram, portanto, comparados entre si e também correlacionados com os parâmetros hematológicos e parasitológicos. A média dos *scores* dos indivíduos anêmicos ( $-0,69 \pm 0,61$ ) correlacionou-se negativamente com o CP1, enquanto a média dos indivíduos sem anemia ( $0,26 \pm 1,56$ ) estava positivamente relacionada a este componente. Houve diferença estatística significativa ( $p = 0,0013$ ) na diferença das médias entre os grupos, indicando que os pacientes anêmicos possuem anticorpos, principalmente autoanticorpos, em relação aos pacientes não anêmicos (**Figura 20A**). Para o CP2, observou-se um perfil contrário ao do CP1, em que a média dos indivíduos com anemia ( $0,28 \pm 0,97$ ) correlacionou-se positivamente, enquanto a

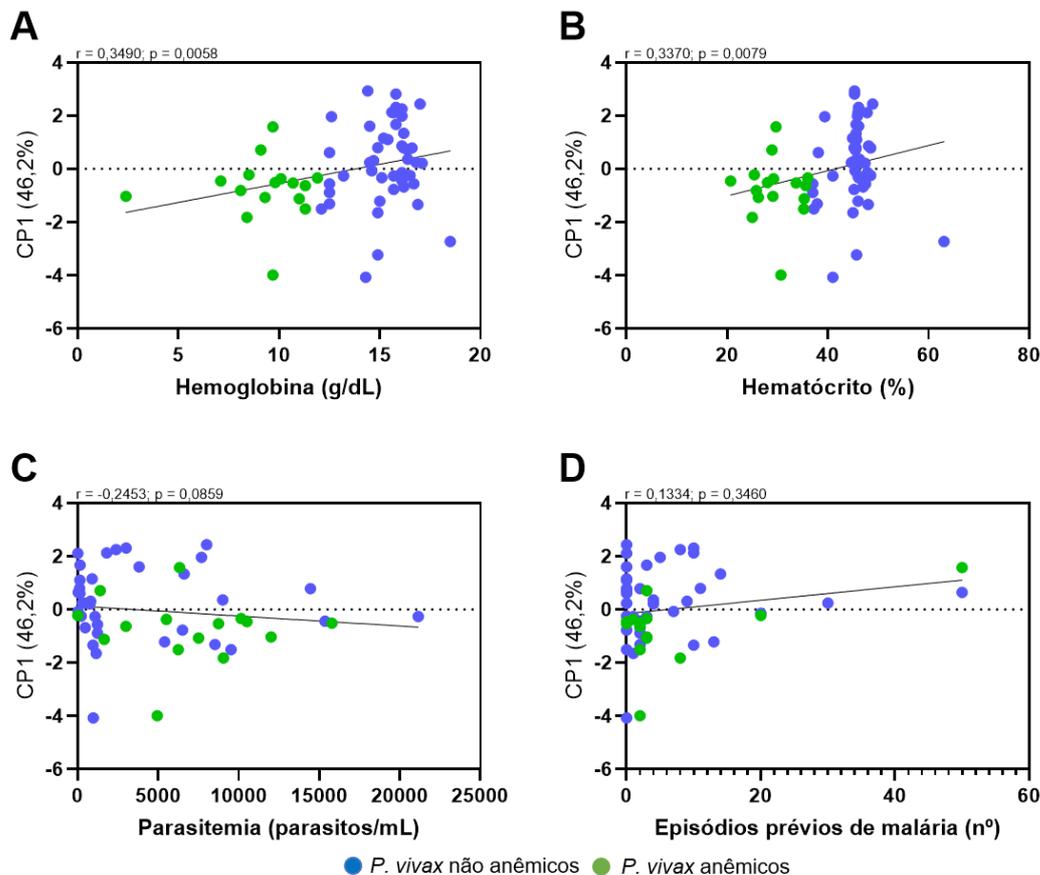
média daqueles sem anemia correlacionou-se negativamente ( $-0,09 \pm 0,96$ ) com este componente. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas, indicando que não há diferença na resposta específica contra *P. vivax* entre os dois grupos (**Figura 20B**).

Com relação à diferença entre os *scores* para o CP3, não foi constatada diferença significativa entre as médias dos *scores* dos pacientes com anemia ( $-0,17 \pm 1,16$ ) e sem anemia ( $0,06 \pm 0,73$ ), sugerindo que não há diferença na resposta predominantemente anti-PS entre os dois grupos (**Figura 20C**). O mesmo resultado foi observado para o CP4, no qual a média dos pacientes anêmicos ( $0,23 \pm 1,05$ ) não se diferencia estatisticamente da média dos pacientes não anêmicos ( $-0,03 \pm 0,56$ ), indicando que não há diferença na resposta relacionada ao estresse eritrocítico (**Figura 20D**).



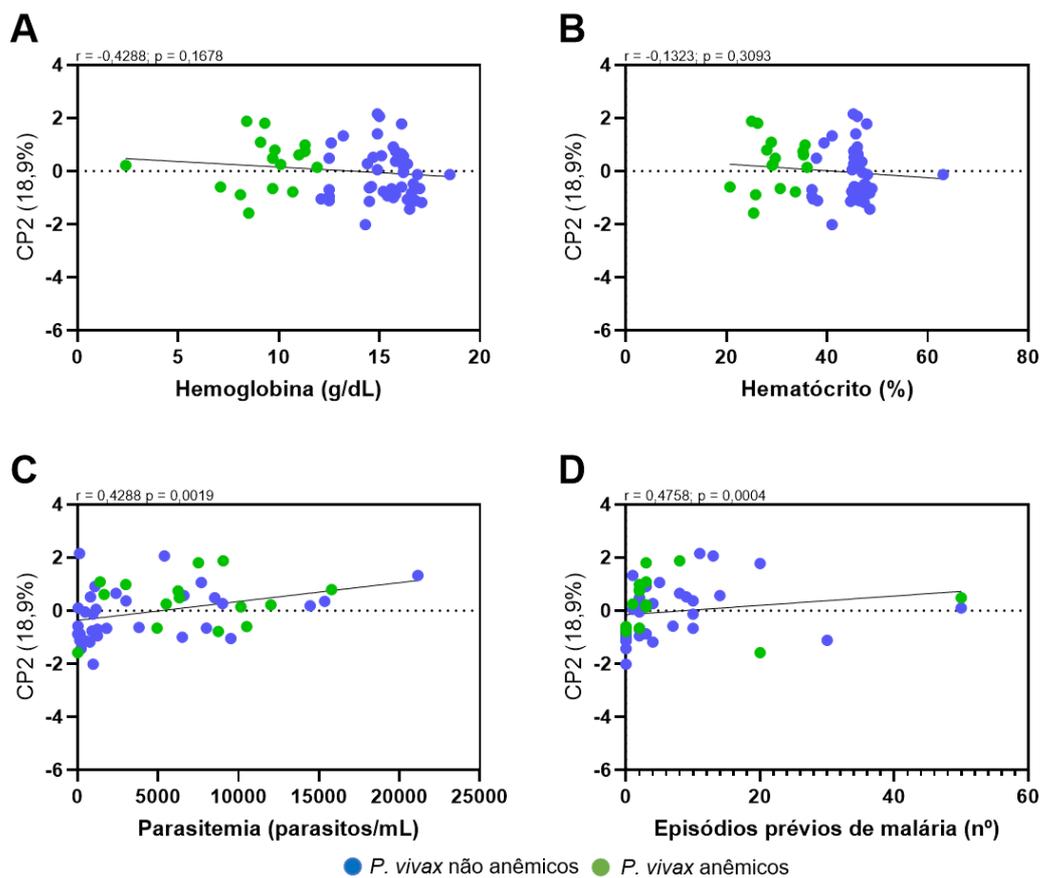
**Figura 20 – Média  $\pm$  desvio padrão dos *scores* referentes aos quatro primeiros CPs dos indivíduos infectados por *P. vivax*. A) CP1, B) CP2, C) CP3 e D) CP4. Os símbolos coloridos indicam a média e as barras flutuantes indicam o desvio padrão de cada grupo. Significância estatística foi acessada pelo teste t não pareado de Student com correção de Welch e está representada por asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).**

Os níveis de hemoglobina ( $r = 0,3490$ ;  $p = 0,0058$ ) e o hematócrito ( $r = 0,3370$ ;  $p = 0,0079$ ) correlacionaram-se positivamente com os *scores* do CP1 indicando que a presença de autoanticorpos está correlacionada com o quadro anêmico apresentado pelos indivíduos infectados por *P. vivax* (**Figura 21A,B**). A parasitemia ( $r = -0,2453$ ;  $p = 0,0859$ ) e a exposição prévia ( $r = 0,1334$ ;  $p = 0,3460$ ) não se correlacionaram de maneira significativa com o CP1, indicando que a presença destes autoanticorpos não está associada ao nível de parasitos no sangue nem com a exposição destes indivíduos a infecções por *Plasmodium* spp. (**Figura 21C,D**).



**Figura 21 – Correlações entre os *scores* do CP1 e os parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por *P. vivax*. A) nível de hemoglobina, B) hematócrito, C) parasitemia, D) episódios prévios de malária. Os diferentes grupos estão representados com diferentes cores de acordo com a legenda. As correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.**

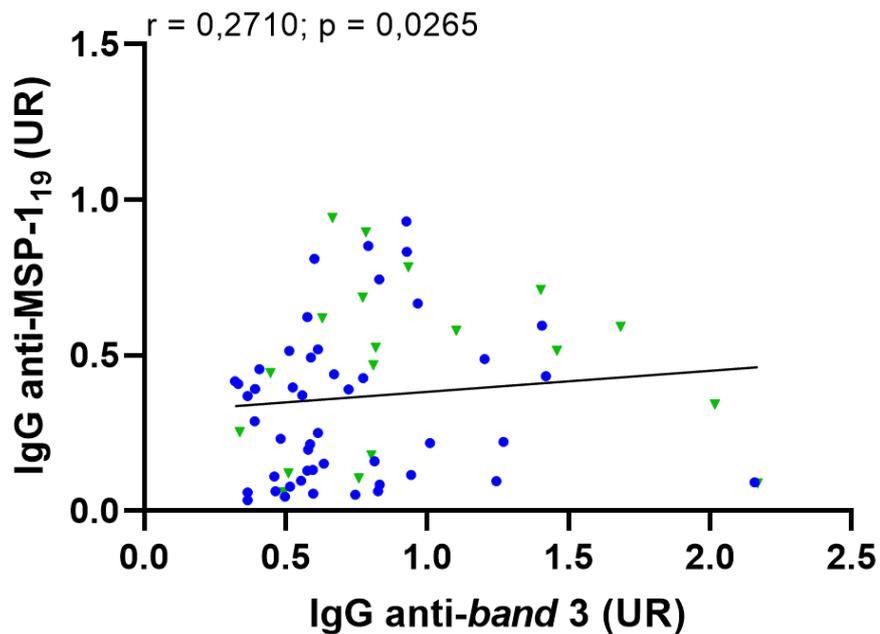
Com relação às correlações com os *scores* do CP2, verificou-se a ausência de correlações significativas com os níveis de hemoglobina ( $r = -0,4288$ ;  $p = 0,1678$ ) e hematócrito ( $r = -0,1323$ ;  $p = 0,3093$ ), sugerindo que a resposta específica a IgG *PvMSP-1<sub>19</sub>* não está correlacionada ao quadro anêmico apresentado pelos pacientes, embora eles tenham, no geral, mais anticorpos (**Figura 22A,B**). Para os parâmetros parasitológicos, constatou-se correlação positiva dos *scores* do CP2 com a parasitemia ( $r = 0,4288$ ;  $p = 0,0019$ ) e os episódios prévios de malária ( $r = 0,4758$ ;  $p = 0,0004$ ), indicando que a resposta específica anti-*P. vivax* está relacionada a parâmetros intrinsecamente relacionados à presença e exposição ao parasito e não ao quadro clínico provocado pela infecção (**Figura 22C,D**). Para o CP3 e CP4 não foi observada correlação significativa com nenhum parâmetro avaliado.



**Figura 22 – Correlações entre os *scores* do CP2 e os parâmetros hematológicos e parasitológicos dos pacientes infectados por *P. vivax*.** A) nível de hemoglobina, B) hematócrito, C) parasitemia, D) episódios prévios de malária. Os diferentes grupos estão representados com diferentes cores de acordo com a legenda. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 3.4.4.4. Correlação entre os níveis de anticorpos anti-*Pv*MSP-119 e os antígenos testados

A fim de analisar se a resposta de IgG anti-*Pv*MSP-119 se correlacionava com a resposta autoimune, foram feitos testes de correlações diretas. Contudo, foi observada apenas uma fraca correlação direta com anticorpos anti-*band* 3 ( $r = 0,2710$ ;  $p = 0,0265$ ) (**Figura 23**). Para os demais autoantígenos avaliados não se observou nenhuma correlação com a resposta anti-parasitária.

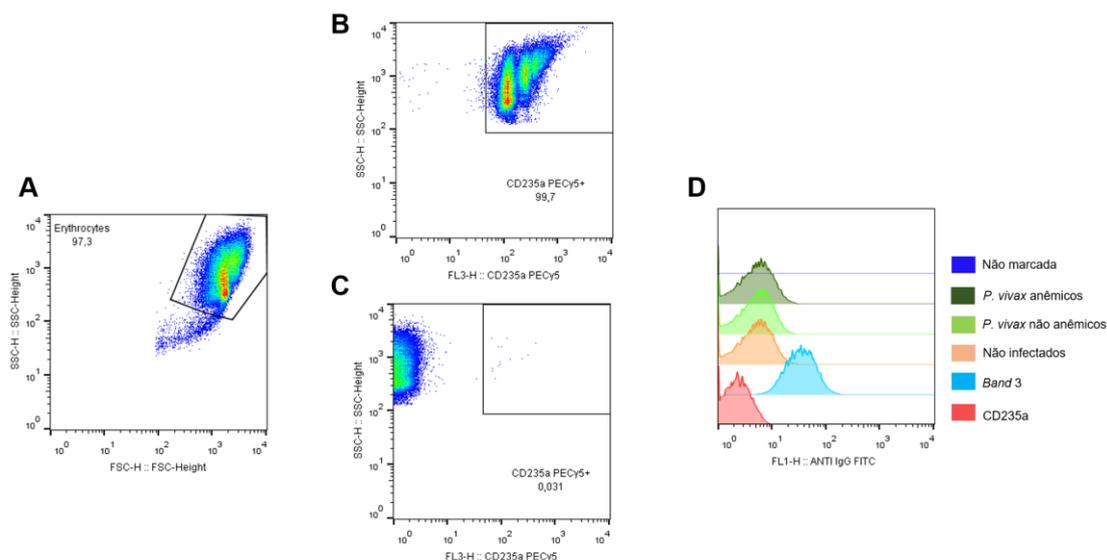


**Figura 23** – Correlação entre a resposta específica anti-*P. vivax* e a resposta anti-*band* 3. Os círculos azuis indicam os pacientes infectados por *P. vivax* que não apresentam anemia e os triângulos invertidos verdes são os pacientes anêmicos. Correlação foi feita utilizando o teste de correlação de Spearman seguido de uma regressão linear. Valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.4.5. Intensidade de ligação de anticorpos purificados dos diferentes grupos estudados a eritrócitos de doadores infectados e não infectados

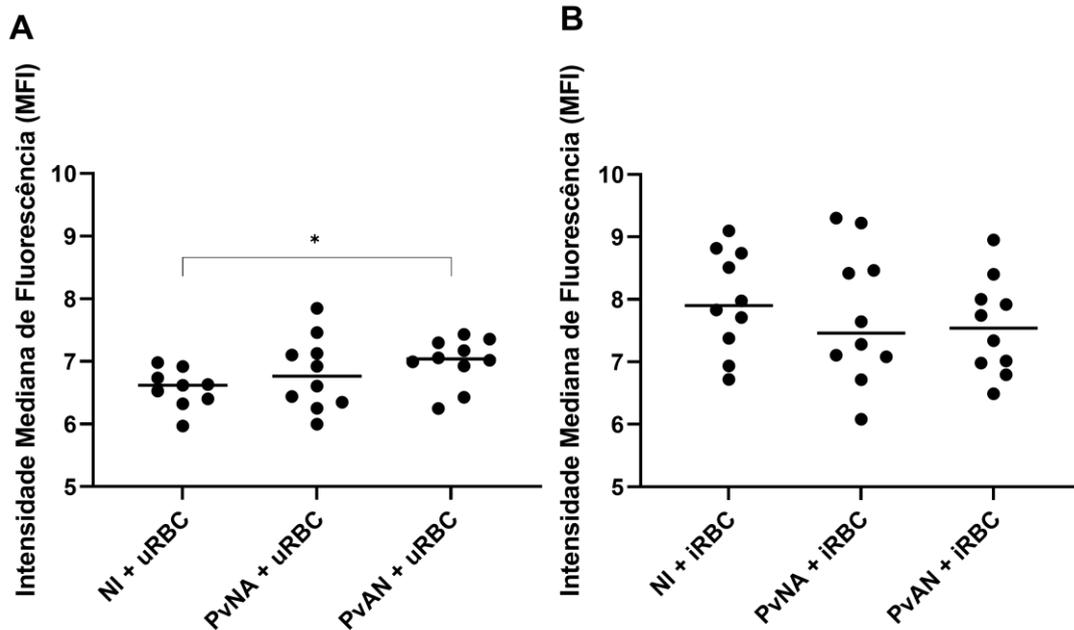
Um ensaio de citometria de fluxo foi feito como um outro método de identificar autoanticorpos que se ligam a eritrócitos não infectados, bem como para avaliar se o H<sub>2</sub>DIDs é capaz de bloquear total ou parcialmente a ligação de anticorpos anti-*band 3* em eritrócitos.

Este ensaio buscou avaliar a intensidade de ligação de anticorpos purificados dos três diferentes grupos de estudo em eritrócitos não infectados de doadores saudáveis e de doadores infectados por *P. vivax*. A estratégia de *gating* utilizada está representada na **Figura 24**. Primeiro foi selecionada a população de eritrócitos de acordo com tamanho e granulosidade (**Figura 24A**). Após este passo, utilizando o canal para o fluorocromo PE-Cy5, selecionamos apenas as células que foram marcadas com anti-CD325a (**Figura 24B,C**). Dentro deste *gate*, calculamos a mediana de intensidade de fluorescência de anti-IgG-FITC ou anti-*band 3*-FITC (**Figura 24D**).



**Figura 24 – Estratégia de *gating* utilizada para calcula do MFI e da frequência.** A) *Gate* na população de eritrócitos por granulosidade e tamanho, B) *Gate* na população marcada com anti-CD235a-PE-Cy5, C) *Gate* representativo de uma amostra não marcada com anti-CD235a; D) Histograma representativo da população FITC positiva em seis amostras representativas: eritrócitos não marcados, opsonizado com anticorpos purificados de indivíduos infectados por *P. vivax* com ou sem anemia, anticorpos de indivíduos não infectados, opsonizadas apenas com anti-*band* 3-FITC e apenas com anti-CD235a-PE-Cy5.

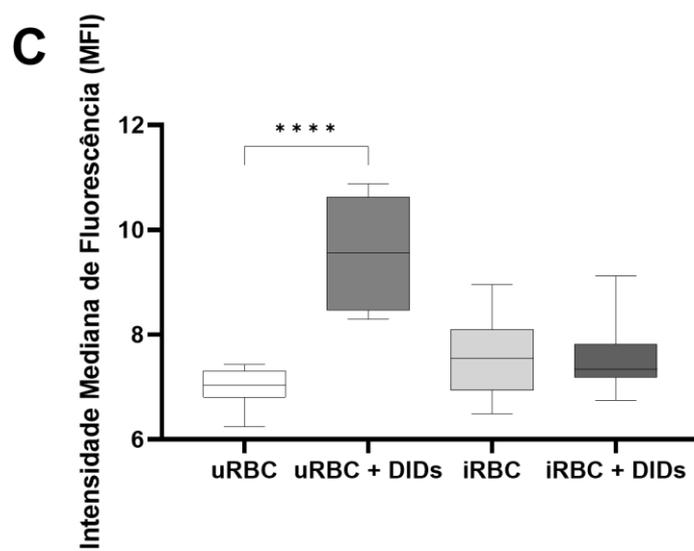
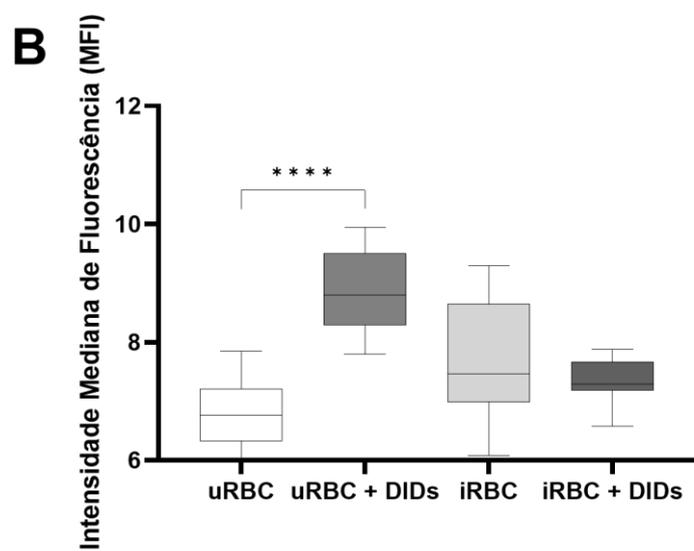
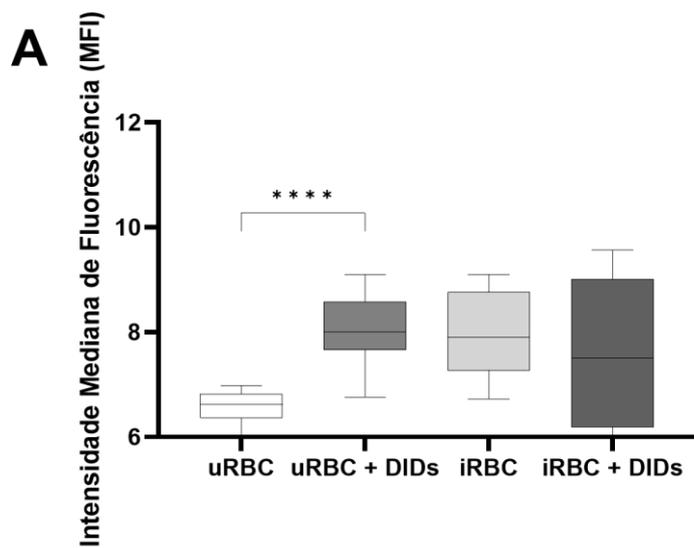
Ao avaliarmos a intensidade mediana de fluorescência, foi possível observar diferença estatística significativa apenas entre a intensidade de ligação de anticorpos purificados provenientes de indivíduos não infectados a eritrócitos de indivíduos saudáveis (6,6 [6,3-6,8]) e de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* (7,0 [6,8-7,3]) ( $p = 0,00133$ ) (**Figura 25A**). Não foi encontrada diferença estatística significativa na opsonização de eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax* (**Figura 25B**).



**Figura 25 – Diferença na intensidade mediana de fluorescência de anticorpos IgG ligados a eritrócitos. A)** eritrócitos de indivíduos não infectados e **B)** eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax*. A linha central representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). NI = não infectado, PvNA = *P. vivax* não anêmicos, PvAN = *P. vivax* anêmicos, uRBC = eritrócitos de indivíduos não infectados, iRBC = eritrócitos de indivíduos infectados. Significância estatística foi acessada pelo teste de Mann-Whitney e está representada por asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 3.4.6. Diferença na opsonização de anticorpos antes e após adição de H<sub>2</sub>DIDs em eritrócitos

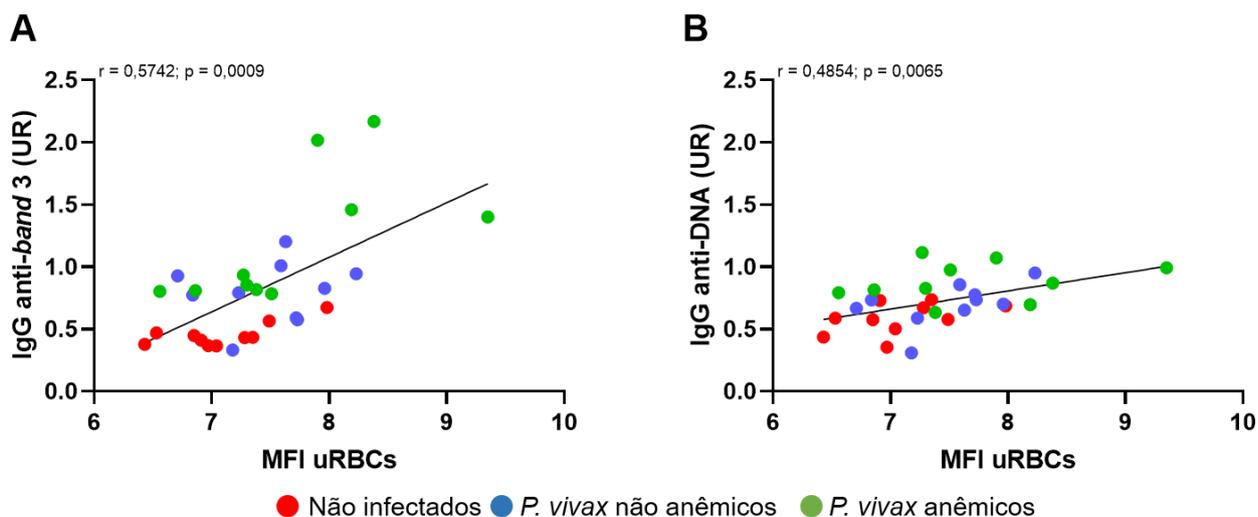
Para acessar se a ligação dos anticorpos purificados dos diferentes grupos de estudo era, majoritariamente, anti-*band 3*, fizemos um ensaio utilizando o bloqueador do canal iônico desta proteína (H<sub>2</sub>DIDs). Verificamos que, para eritrócitos de pacientes infectados por *P. vivax*, não houve diferença na opsonização após a adição de H<sub>2</sub>DIDs. No entanto, houve um aumento da opsonização por anticorpos purificados de indivíduos não infectados (**Figura 26A**), infectados por *P. vivax* sem (**Figura 26B**) e com (**Figura 26C**) anemia após a adição de H<sub>2</sub>DIDs em eritrócitos de indivíduos saudáveis.



**Figura 26 – Diferença na intensidade mediana de fluorescência antes e após adição de H<sub>2</sub>DIDs.** A) Eritrócitos opsonizados com anticorpos de indivíduos não infectados; B) Eritrócitos opsonizados com anticorpos de indivíduos não anêmicos infectados por *P. vivax*; e C) Eritrócitos opsonizados com anticorpos de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax*. A linha central dos *boxes* representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). NI = não infectado, PvNA = *P. vivax* não anêmicos, PvAN = *P. vivax* anêmicos, uRBC = eritrócitos de indivíduos não infectados, iRBC = eritrócitos de indivíduos infectados. Significância estatística foi acessada pelo teste de Mann-Whitney e está representada por asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 3.4.7. Correlações entre eritrócitos opsonizados e resposta a autoantígenos

Para tentar discriminar quais antígenos são os principais alvos do reconhecimento de eritrócitos de indivíduos não infectados, bem como de indivíduos infectados por *P. vivax*, a intensidade mediana/média de fluorescência, bem como a frequência de células positivas foram correlacionadas com os níveis de anticorpos dos indivíduos utilizados no ensaio. Para a intensidade mediana de fluorescência foi observada correlação positiva com a resposta anti-*band 3* e eritrócitos vindos de indivíduos não infectados ( $r = 0,5742$ ;  $p = 0,0009$ ) (**Figura 27A**) e também para a resposta anti-DNA ( $r = 0,4854$ ;  $p = 0,0065$ ) (**Figura 27B**). Não foi observada nenhuma correlação estatisticamente significativa para todos os outros antígenos testados, inclusive para os peptídeos utilizados neste trabalho.



**Figura 27 – Correlações entre a MFI de eritrócitos de indivíduos não infectados e a resposta anti-*band 3* e anti-DNA.** A) IgG anti-*band 3* e B) IgG anti-DNA. Os dados para cada indivíduo estão sinalizados com cores de acordo com a legenda. Fizeram-se correlações utilizando o teste de correlação

de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Juntos, estes dados discriminam que a resposta à proteína *band 3* seja o principal antígeno reconhecido por anticorpos de indivíduos anêmicos infectados por *P. vivax* na superfície de eritrócitos. Além disso, o aumento de IgG anti-DNA parece estar correlacionado com o aumento da opsonização de eritrócitos não infectados.

Com os dados obtidos no capítulo 1, optamos com explorar melhor a proteína *band 3*, buscando responder a questões como: Quais são os epítomos principais reconhecidos por autoanticorpos? Eles correspondem a epítomos preditos *in silico*? Em quais porções da proteína estão estes epítomos? Por este motivo, o capítulo 2 foi totalmente focado na proteína *band 3* e seus epítomos.

### 3.5. DISCUSSÃO

A anemia na malária é multifatorial e, ainda, não se tem um consenso de qual é o principal fator que leva a destruição de eritrócitos não infectados. Um dos elementos que vem sendo estudado há bastante tempo são os autoanticorpos (ROSENBERG et al., 1973; WOODRUFF; ANSDELL; PETTITT, 1979; FACER, 1980; FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016; MOURÃO et al., 2016, 2018; RIVERA-CORREA et al., 2017, 2019a, 2019b, 2020; VENTURA et al., 2018; SALEH et al., 2023) que poderiam desempenhar um papel importante na remoção destas células da corrente sanguínea. Embora a presença desses autoanticorpos já tenha sido identificada em infecções por *P. vivax* e por *P. falciparum*, o papel efetor destas moléculas ainda é pouco estudado. Com o intuito de contribuir para o entendimento de quais autoantígenos estariam sendo mais reconhecidos em infecções por *P. vivax*, bem como a dinâmica de relação entre esses autoanticorpos durante a infecção, e se algum destes anticorpos estariam associados ao quadro anêmico apresentado por alguns pacientes, o presente estudo avaliou a resposta de anticorpos IgG contra diversos antígenos próprios do hospedeiro.

De maneira geral, nossos resultados evidenciam que pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* possuem maiores níveis de anticorpos direcionados a autoantígenos em comparação aos pacientes não anêmicos e indivíduos infectados. Contudo, a resposta específica anti-parasitária não se diferencia estatisticamente entre os dois grupos de pacientes infectados, indicando, assim, que os pacientes anêmicos possuem uma resposta autoimune pronunciada, não só pela presença de níveis mais elevados de anticorpos totais (MOURÃO et al., 2016), mas também pelo aparecimento de anticorpos autorreativos específicos contra eritrócitos íntegros, *band 3* e DNA. A elevada produção de autoanticorpos durante a malária pode ser justificada por diversas perspectivas. Durante o curso da infecção, a lise de eritrócitos infectados resulta na exposição de proteínas citoplasmáticas, e determinados antígenos parasitários, que podem induzir, por exemplo, uma ativação policlonal não específica de células B (FREEMAN; PARISH, 1978; MINOPRIO, 2001). Alguns estudos relatam uma refratariedade de células B de perfil atípico a secretarem anticorpos *in vitro*, além de possuírem uma redução dos receptores BCR em resposta a alguns antígenos solúveis (PORTUGAL et al., 2015), contudo, essas mesmas células mostraram ser responsivas a

antígenos ligados à membrana celular (AMBEGAONKAR et al., 2020). Além disso, evidências diretas, utilizando células de pacientes infectados por *P. falciparum* e por *P. vivax*, indicam que as células B atípicas secretam anticorpos autorreativos e que estes estão associados ao quadro anêmico dos pacientes (RIVERA-CORREA et al., 2019b, 2020).

A presença de autoanticorpos contra antígenos eritrocitários é bem descrita em infecções por *Plasmodium* spp (BERZINS; WAHLGREN; PERLMANN, 1983; FERNANDES et al., 2008; MOURÃO et al., 2016, 2020; CASTRO-SALGUEDO; MENDEZ-CUADRO; MONERIZ, 2021; SALEH et al., 2023). Além disso, foram evidenciados, inclusive por nosso grupo de pesquisa, mecanismos que sugerem a remoção de eritrócitos não infectados opsonizados por esses autoanticorpos. Estes autoanticorpos se ligariam à membrana de eritrócitos, diminuindo a dinâmica de fluidez da membrana e, conseqüentemente, enrijecendo as células tornando-as mais facilmente fagocitadas por macrófagos residentes do baço (MOURÃO et al., 2016, 2020). No entanto, ainda são necessários estudos para esclarecer outros mecanismos que estariam envolvidos na remoção de células saudáveis durante a malária.

Embora ainda existam incertezas, os estudos sobre os papéis dos anticorpos anti-eritrócitos na malária já indicam uma direção a seguir, ao contrário do papel dos anticorpos anti-DNA, no qual o papel na destruição de eritrócitos, durante a anemia, permanece ambíguo. A presença destes anticorpos já foi descrita anteriormente em infecções por *P. vivax* (RIVERA-CORREA et al., 2020) e também em infecções por *P. falciparum* (DANIEL-RIBEIRO et al., 1983; PHANUPHAK; TIRAWATNPONG; PANMUONG, 1983; BOONPUCKNAVIG, 1984; BAKER et al., 2008; RIVERA-CORREA et al., 2019a, 2019b). Interessantemente, neste estudo, os níveis de anticorpos anti-DNA se correlacionaram negativamente com os parâmetros hematológicos, indicando uma associação com a anemia em infecções por *P. vivax*, como já descrito anteriormente em outra coorte de pacientes infectados por esta espécie (RIVERA-CORREA et al., 2020).

O papel de anticorpos anti-DNA na destruição de eritrócitos durante a anemia ainda é incerto. No entanto, Hotz e colaboradores (2018) demonstraram que, em condições de homeostase, a maioria do DNA mitocondrial livre em células está associada aos eritrócitos em vez de estar livre no plasma, sugerindo que os eritrócitos desempenham um papel de ligação para esse DNA em condições normais. Em uma análise mais aprofundada, os autores constataram que a ligação dessas moléculas de

DNA aos eritrócitos tinha a capacidade de prevenir danos inflamatórios pulmonares causados por esses ácidos nucleicos. Outro aspecto intrigante é que um quadro anêmico poderia aumentar a concentração de DNA mitocondrial no plasma devido à menor disponibilidade de eritrócitos circulantes, mas tal feito não foi observado pelos pesquisadores (HOTZ et al., 2018).

Associando essas informações com as descritas por HOTZ et al., 2018, podemos inferir que os eritrócitos não infectados estejam carregando DNA mitocondrial livre para tentar manter a homeostase e impedir o dano tecidual provocado pela resposta imune altamente inflamatória. Curiosamente, a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é o segundo quadro clínico mais comum em malária grave por *P. vivax* (GENTON et al., 2008; TJITRA et al., 2008; LACERDA et al., 2012) e parece estar associada ao alto perfil inflamatório provocado por infecções por esta espécie de parasito (LACERDA et al., 2012; VAL et al., 2017). A produção de citocinas pró-inflamatórias, durante a malária vivax, pode levar à perda da barreira alveolar e ao aumento da permeabilidade, aumentando o dano aos pulmões (ANSTEY et al., 2009; MOKRA; KOSUTOVA, 2015). Contudo, este seria o possível cenário de pacientes com SDRA, o que não é o caso deste estudo.

Embora o Brasil não tenha áreas com alta endemicidade, os pacientes, utilizados neste estudo, tiveram altos níveis de anticorpos anti-DNA e estes se correlacionaram negativamente com a anemia e, positivamente, com a intensidade de ligação de anticorpos totais a eritrócitos não infectados de indivíduos saudáveis. Uma justificativa para o aparecimento de anticorpos anti-DNA é que, durante o ciclo natural do parasito, ocorra a deposição de DNA parasitário na superfície dos eritrócitos após a ruptura do eritrócito infectado, ou mesmo que os danos teciduais, causados pelo perfil inflamatório elevado das infecções por *P. vivax*, induzam à morte celular, resultando na liberação de fragmentos de DNA que se ligam aos eritrócitos. Assim, ao atravessarem os capilares sinusoides, as células apresentadoras de antígenos podem processar esses fragmentos de DNA, apresentando-os às células B, iniciando uma ativação policlonal para a produção de anticorpos anti-DNA. No entanto, se esses anticorpos contribuem para a anemia ou são apenas uma consequência do estado anêmico inflamatório merece uma análise mais aprofundada em estudos futuros.

É bem estabelecido na literatura que infecções por *P. vivax* (FACER; AGIOSTRATIDOU, 1994; BARBER et al., 2019; RIVERA-CORREA et al., 2020) e por *P. falciparum* (FACER; AGIOSTRATIDOU, 1994; FERNANDEZ-ARIAS et al.,

2016; RIVERA-CORREA et al., 2017, 2019a, 2019b; BARBER et al., 2019) induzem à produção de anticorpos anti-PS e que estes anticorpos estão correlacionados com a anemia nestes pacientes. Tanto em infecções por *P. falciparum* quanto em infecções por *P. vivax*, os anticorpos anti-PS são produzidos por células B de memória atípicas (FcRL5<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>), com a expansão celular desse subtipo correlacionando-se diretamente com a parasitemia, mas inversamente com parâmetros indicativos de anemia (RIVERA-CORREA et al., 2019b, 2020). Em camundongos infectados por *P. yoelii*, a expansão destas células ocorre através de receptores do tipo *toll*, mas especificamente o TLR9 (*Toll-like receptor 9*) e por sinalização de IFN- $\gamma$ , e este estímulo estaria ligado ao reconhecimento de DNA parasitário (RIVERA-CORREA et al., 2017).

Contudo, nossos dados mostram que os pacientes anêmicos não possuem significativamente mais IgG anti-PS do que aqueles que não apresentaram anemia e, também, não se correlacionaram com os parâmetros indicativos de anemia. É essencial destacar que os estudos que evidenciam a associação desses anticorpos com os níveis de hemoglobina foram conduzidos em coortes que incluíam pacientes com malária grave por *P. vivax* (FACER; AGIOSTRATIDOU, 1994; RIVERA-CORREA et al., 2020) ou em um contexto epidemiológico completamente diferente do cenário brasileiro (FACER; AGIOSTRATIDOU, 1994; BARBER et al., 2019). Em um destes estudos, especificamente, observou-se que apenas os pacientes com malária grave por *P. vivax* apresentavam níveis de anticorpos anti-PS associados aos níveis de hemoglobina, ao passo que essa correlação não foi evidenciada nos casos não graves (RIVERA-CORREA et al., 2020). Embora seja verdade que casos de malária grave por *P. vivax* ocorram na área endêmica brasileira (ALEXANDRE et al., 2010; LANÇA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2010; LÓPEZ et al., 2023), é relevante notar que os pacientes incluídos neste estudo não apresentavam quadro de malária grave no momento do diagnóstico, no entanto, a presença de anticorpos anti-PS é considerada um indicador patogênico, podendo ter implicações em abortos, trombose e trombocitopenia (ELKON; SILVERMAN, 2012).

Elevados níveis de anticorpos contra proteínas eritrocíticas, especialmente a *band 3*, já foram evidenciados, inclusive por dados do nosso grupo de pesquisa (MOURÃO et al., 2016, 2018; CASTRO-SALGUEDO; MENDEZ-CUADRO; MONERIZ, 2021). É importante lembrar que *P. vivax* interage com esta proteína no momento de invasão celular (ALAM et al., 2016, 2015). Esta interação parasito-hospedeiro pode estar relacionada ao surgimento destes autoanticorpos por diversos

mecanismos que induzem uma resposta autorreativa, como o mimetismo molecular (CUSICK; LIBBEY; FUJINAMI, 2012; ROJAS et al., 2018) ou o espalhamento de epítomos (POWELL; BLACK, 2001; CORNABY et al., 2015). Ainda não se dispõe de informações conclusivas sobre a interação entre a PvMSP-1<sub>19</sub> e a *band 3*; no entanto, documentou-se que *P. falciparum* emprega a forma autóloga dessa proteína durante o processo de invasão, e o reconhecimento ocorre em um sítio intracelular específico da proteína eritrocitária (GOEL et al., 2003; ARAKAWA et al., 2015). A MSP-1 foi previamente estabelecida como uma proteína crucial para a sobrevivência dos parasito do gênero *Plasmodium* (OH et al., 2000; DAS et al., 2015); portanto, existe a possibilidade de que a PvMSP-1<sub>19</sub> interaja com a *band 3*.

Durante as respostas iniciais ao parasito, a proteína *band 3* passa por modificações conformacionais, levando a exposição de novos epítomos (PANTALEO et al., 2008; DEROOST et al., 2016; BADIOR; CASEY, 2021). Como estas mudanças conformacionais estão associadas à deposição de hemicromo e à geração de espécimes reativas de oxigênio, elas podem persistir mesmo após a eliminação do parasito da corrente sanguínea, levando a mudanças na troca de íons pela proteína (DEROOST et al., 2016), afetando a homeostase e função dos eritrócitos, logo, facilitando a remoção destas células e, assim, contribuindo para o quadro anêmico durante a infecção. Estudos apontam que *P. vivax* é capaz de deixar o reticulócito do hospedeiro mais intável do que eritrócitos infectados por *P. falciparum* e por *P. knowlesi*, dados que sugerem que esta espécie é capaz não só de comprometer a sua célula hospedeira, mas as células do meio também (CLARK et al., 2021). Nossos dados são consistentes com esse achado, uma vez que a instabilidade dos eritrócitos não infectados, durante a infecção por *P. vivax*, poderia levar à deformação da proteína *band 3*, expondo novos antígenos e elevando a concentração de anticorpos anti-*band 3* no plasma destes indivíduos.

Ainda não se dispõe de informações conclusivas sobre a interação entre a PvMSP-1 e a *band 3*; no entanto, já foi documentado que *P. falciparum* emprega a forma autóloga dessa proteína durante o processo de invasão, e o reconhecimento ocorre em um sítio intracelular específico da *band 3* (GOEL et al., 2003; ARAKAWA et al., 2015). A MSP-1 foi previamente estabelecida como uma proteína crucial para a sobrevivência de parasitos do gênero *Plasmodium* (OH et al., 2000; DAS et al., 2015); portanto, existe a possibilidade de que a PvMSP-1 interaja com a *band 3*, uma hipótese que é respaldada nesse estudo, uma vez que os níveis de anticorpos contra essa proteína parasitária apresentaram correlação, mesmo que fraca, apenas com a resposta anti-*band*

3. E, caso essa interação ocorra de forma similar à existente em infecções por *P. falciparum*, é possível que haja a formação de neoantígenos devido à interação parasito-hospedeiro no momento da invasão celular.

Utilizamos o H<sub>2</sub>DIDs como um meio de bloquear a *band 3*, através do bloqueio do canal iônico, no entanto foi observado um aumento da reatividade aos eritrócitos opsonizados após a adição deste reagente. A resposta acentuada, observada na intensidade de ligação de anticorpos purificados aos eritrócitos não infectados após a adição de H<sub>2</sub>DIDs, pode ser elucidada pelo surgimento de novos epítomos resultantes da deformabilidade da proteína. Embora se tenha constatado que esse reagente não possui a capacidade de deformar os eritrócitos (IVANOV; PAARVANOV, 2021). Alternativamente, é possível que o estresse induzido pelo processo de congelamento-descongelamento, bem como as etapas de centrifugação, tenham contribuído para a deformabilidade e flexibilidade da proteína, resultando na apresentação de novos epítomos de maneira “natural” (BADIOR; CASEY, 2021). Interessantemente, os eritrócitos provenientes de indivíduos infectados não apresentaram este comportamento, não tendo sido observada diferença estatística antes e após adição do H<sub>2</sub>DIDs.

É importante mencionar que os eritrócitos utilizados para o experimento com H<sub>2</sub>DIDs foram descongelados no dia anterior ao experimento e deixados a 4°C *overnight*. Todos esses passos podem ter influenciado nos resultados aqui apresentados, portanto, estes são experimentos que devem ser refeitos, de preferência com eritrócitos frescos, para que se obtenha o resultado mais próximo do real. Outra alternativa é realizar os ensaios utilizando *ghosts* dos eritrócitos congelados, uma vez que é dessa forma que estas células são utilizadas em ensaios de verificação da funcionalidade dos canais iônicos da *band 3* (BERTOCCHIO et al., 2020).

De maneira intrigante, o sítio de ligação do H<sub>2</sub>DIDs é acessível apenas pela face extracelular da proteína (KNAUF et al., 2004). Essa informação levou-nos a formular a hipótese de que os anticorpos presentes em pacientes anêmicos podem estar interferindo no canal iônico dos eritrócitos. Tal intervenção poderiam resultar na deformabilidade da membrana (MOURÃO et al., 2016; 2020), potencialmente contribuindo para a remoção desses eritrócitos nos capilares sinusoides do baço. Assim, é plausível que esses anticorpos possam facilitar a deformabilidade da membrana eritrocítica, expondo antígenos “crípticos” da *band 3*, intensificando o reconhecimento dessas células por tais anticorpos autorreativos. Para validar essa hipótese, são necessários estudos adicionais

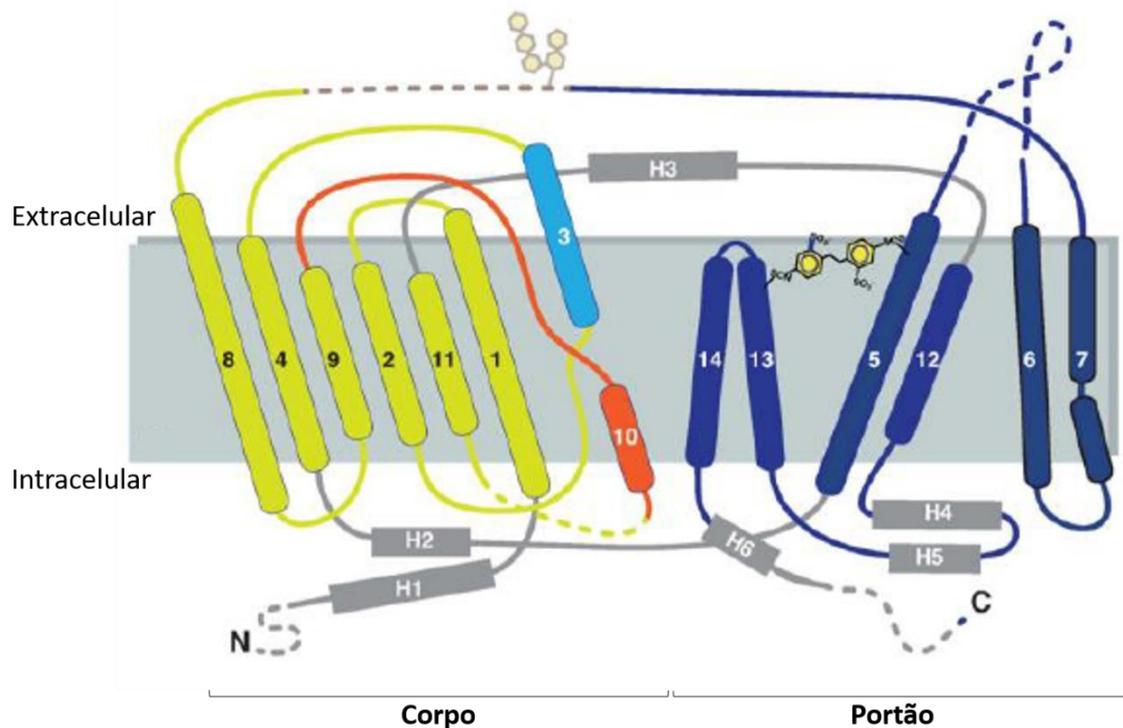
que empreguem modelos de bloqueio de canais iônicos da *band 3* (BERTOCCHIO et al., 2020), utilizando os anticorpos utilizados neste estudo.

Por fim, este capítulo acrescenta informações importantes ao entendimento da resposta autoimune a diversos autoantígenos em uma análise multivariada que apontou que o aumento de anticorpos autorreativos está relacionado à infecção por *P. vivax*. No entanto, não foi encontrada nenhuma correlação entre parasitemia e exposição prévia à malária e os níveis de quaisquer dos autoanticorpos, indicando que a formação da resposta autoimune não está correlacionada com a quantidade de parasitos ou com a exposição prévia à malária, mas sim com outros fatores como, por exemplo, predisposição genética do hospedeiro ou até mesmo a cepa do parasito causando a infecção. Contudo, estas são variáveis que necessitam de mais exploração para entender o porquê da formação da resposta autoimune em alguns indivíduos e outros não. Ainda, *band 3* parece ser o principal antígeno reconhecido por pacientes anêmicos e IgG anti-*band 3*, o principal anticorpo que participa da opsonização de eritrócitos não infectados. Por essa razão, decidimos explorar quais são os principais epítomos reconhecidos na proteína *band 3* no capítulo 2.

## 4. CAPÍTULO 2: EPÍTOPOS DA PROTEÍNA *BAND 3* RECONHECIDOS POR AUTOANTICORPOS DE PACIENTES ANÊMICOS INFECTADOS POR *P. VIVAX*

### 4.1.1. Proteína *band 3* (AE1/SLC4A1)

A proteína *band 3*, também conhecida por AE1 (*anion exchanger 1*), capnóforina e SLC4A1, é a mais abundante da superfície de eritrócitos humanos, e também está presente em células renais (KOLLERT-JÖNS et al., 1993) e células cardíacas (ALVAREZ et al., 2007). A versão eritrocítica é uma glicoproteína de 110 kDa (911 resíduos de aminoácidos (aa)) e possui dois domínios distintos; o domínio N-terminal citoplasmático e hidrofílico, composto por 360 aa, e o domínio transmembrana (TM), composto por 551 aa e predominantemente hidrofóbico, com uma pequena sequência C-terminal hidrofílica (TANNER; MARTIN; HIGH, 1988; LUX et al., 1989). O domínio citoplasmático ancora a proteína ao citoesqueleto celular, estabelecendo uma ligação com a anquirina (BENNETT; STENBUCK, 1979), que, por sua vez, se liga à hemoglobina e enzimas glicolíticas (LOW, 1986). O domínio TM é composto por 14 segmentos, divididos em dois domínios estruturais; TMs 1-4 e 8-11 são denominados de “corpo”, enquanto TMs 5-7 e 12-14 são denominados de “portão” (ARAKAWA et al., 2015) (**Figura 28**).

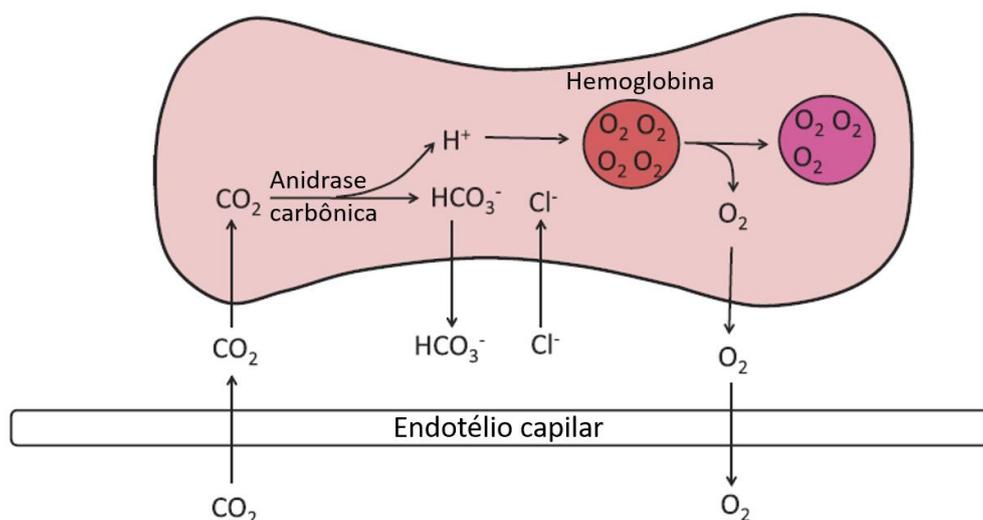


**Figura 28 – Modelo estrutural da proteína *band 3*.** Estrutura da proteína vista de forma plana na membrana citoplasmática de eritrócitos. Os TMs correspondentes ao domínio “corpo” estão representados em amarelo e os correspondentes ao domínio “portão” estão em azul. Adaptado de Arakawa et al., 2015.

Devido à sua abundância na membrana citoplasmática e à presença de domínios intracelulares, a *band 3* interage com várias outras proteínas, como a glicoforina A (WILLIAMSON; TOYE, 2008) e a anidrase carbônica II (VINCE; REITHMEIER, 1998, 2000). Naturalmente, a *band 3* está localizada em forma de dímeros na membrana citoplasmática, embora também possa se apresentar em formas monoméricas (BOODHOO; REITHMEIER, 1984; LINDENTHAL; SCHUBERT, 1991; SALHANY; CORDES; SLOAN, 2000). Estes dímeros podem interagir entre si, formando tetrâmeros de proteína (SALHANY; CORDES; SLOAN, 2000). Os dímeros estão envolvidos na ligação da *band 3* à espectrina-actina, ao passo que os tetrâmeros são responsáveis pela ligação à anquirina (IVANOV; PAARVANNOVA, 2021). Processos patofisiológicos (LOW et al., 1985; WAUGH; LOW, 1985; SCHLÜTER; DRENCKHAHN, 1986; WAUGH et al., 1986; DE FRANCESCHI et al., 1998; ARASHIKI et al., 2013) estão associados à formação de *clusters* de *band 3* maiores que tetrâmeros, inclusive, alguns deles relacionados à formação de autoanticorpos (SCHLÜTER; DRENCKHAHN, 1986) e anemia (DE FRANCESCHI et al., 1998).

Do ponto de vista funcional, esta proteína desempenha um papel crucial como canal iônico, promovendo a troca de  $\text{Cl}^-$  por  $\text{HCO}_3^-$  em ambos os fluxos, uma das etapas

fundamentais na secreção de  $\text{CO}_2$  nos capilares pulmonares, contribuindo para a homeostase celular e do pH sanguíneo (revisado por JENNINGS, 2021) (**Figura 29**). Além disso, atua também como um canal iônico para troca de  $\text{SO}_4^{2-}$  e diversos outros íons orgânicos e inorgânicos (KNAUF; ROTHSTEIN, 1971; HO; GUIDOTTI, 1975; ZAKI et al., 1975; CHEN et al., 2024). Um agente amino-reativo, conhecido como  $\text{H}_2\text{DIDS}$  ( $[\text{}^3\text{H}]4,4\text{-diisothiocyano-dihidroestilbene-2,2'-disulfonate}$ ), se liga covalentemente às lisinas presentes nas posições 539 e 851 (JENNINGS; PASSOW, 1979; OKUBO et al., 1994), presentes nos TMs 5 e 13, respectivamente, bloqueando e inibindo o transporte de íons pela proteína (CABANTCHIK; ROTHSTEIN, 1974; LEPKE et al., 1976; SHIP et al., 1977). Essa é uma ligação que pode ser intramonomérica (CABANTCHIK; ROTHSTEIN, 1974) ou também entre os dímeros e os tetrameros da proteína (IVANOV; PAARVANOV, 2021). A descoberta deste e de outros inibidores dos canais iônicos foi fundamental para identificar esta proteína como o principal canal iônico nos eritrócitos humanos.



**Figura 29 – Esquema da troca de íons pelos eritrócitos durante o processo de respiração.** Moléculas de  $\text{CO}_2$  são incorporadas pela célula e convertidas em  $\text{HCO}_3^-$  e liberam prótons devido a ação da anidrase carbônica. O aumento da concentração de  $\text{HCO}_3^-$  citoplasmático dá início ao efluxo deste íon, sendo contrabalanceado pelo influxo de íons  $\text{Cl}^-$ . O aumento de prótons intracelular é tamponado pela hemoglobina, facilitando, assim, a liberação de moléculas de  $\text{O}_2$ . Adaptador de Jennings, 2021.

Apesar de o transporte de íons pela *band 3* ser ativo durante toda a vida útil da célula, alguns fatores podem interromper ou reduzir a função da proteína, como o estresse oxidativo. Isso ocorre com a fosforilação dos resíduos de tirosina da proteína, podendo causar dano oxidativo (LOW et al., 1987; PANTALEO et al., 2016). Esses danos são capazes de inibir o transporte de íons, provocar o deslocamento de enzimas

glicolíticas e a quebra da ligação da *band 3* com a anquirina (PUCHULU-CAMPANELLA et al., 2016). Outro fator que pode interferir no fluxo de íons são as variantes mutantes da proteína que podem aparecer em algumas doenças, como a esferocitose hereditária (DE FRANCESCHI et al., 1997; REITHMEIER et al., 2016), estomatocitose (FRUMENCE et al., 2013; REITHMEIER et al., 2016) e acidose tubular renal distal (TANNER, 2002; REITHMEIER et al., 2016; WATANABE, 2018; BERTOCCHIO et al., 2020).

A fosforilação da *band 3* desempenha um papel regulatório fundamental nos eritrócitos, tanto em termos estruturais quanto fisiológicos (MESSANA et al., 1996; PUCHULU-CAMPANELLA et al., 2016). O deslocamento de enzimas glicolíticas da extremidade N-terminal da proteína, devido à fosforilação, modifica o fluxo metabólico, elevando a taxa de glicólise em resposta à baixa pressão de O<sub>2</sub> (MESSANA et al., 1996; GIBSON; COSSINS; ELLORY, 2000; LEWIS et al., 2009). Isso possibilita uma significativa deformação dos eritrócitos para sua passagem por capilares estreitos, uma vez que a *band 3* fosforilada dissocia-se do citoesqueleto (FERRU et al., 2014). Ao longo do tempo e associada ao estresse oxidativo, a fosforilação induz a fragmentação de complexos ligados à *band 3*, permitindo sua difusão lateral para formar agregados, resultando na desestabilização da membrana e promovendo sua vesiculação (PUCHULU-CAMPANELLA et al., 2016).

Outra função desta proteína é identificar os eritrócitos envelhecidos para a sua remoção através da senescência realizada por macrófagos residentes do baço. Esses macrófagos são capazes de reconhecer IgG acoplados à antígenos, especialmente *band 3*, na superfície dos eritrócitos, e realizar fagocitose (KAY, 1975; KAY et al., 1983; PANTALEO et al., 2008). No entanto, é essencial que a proteína passe por uma alteração seletiva para atuar como antígeno de senescência; essas alterações podem ser de origem oxidativa (KAY et al., 1983). Notavelmente, esses anticorpos se ligam a dois sítios específicos da proteína; entre aa 538-554 (KAY; MARCHALONIS, 1991) e aa 812-830 (KAY; MARCHALONIS, 1991; BADIOR; CASEY, 2021). Essas informações são intrigantes, pois destacam a flexibilidade da proteína, uma vez que o primeiro sítio compreende uma alça extracelular da proteína, enquanto o segundo é totalmente intracelular (ARAKAWA et al., 2015), sugerindo que a proteína é deformável e apresenta, naturalmente, novos epítomos (BADIOR; CASEY, 2021). A formação destes antígenos de senescência tem origem na desnaturação da hemoglobina e na fosforilação da proteína, que leva a uma agregação dos dímeros de *band 3*, formando estes *clusters*

e, conseqüentemente, aumentando a ligação de autoanticorpos marcadores de senescência (LOW et al., 1985; KAY, 2005; PANTALEO et al., 2008, 2009).

Os anticorpos naturalmente formados contra a *band 3* também podem adquirir potencial patogênico, o que pode ocorrer devido a uma falha nos mecanismos de tolerância das células B, levando a uma superestimulação causada pelo aumento da expressão do antígeno de senescência (BLOCH et al., 2020). Isso poderia resultar na produção de autoanticorpos de alta afinidade, semelhante ao observado na anemia hemolítica autoimune (JANVIER et al., 2013; KAWAMOTO et al., 2019; KITAO et al., 2020; BRANCH, 2023). Durante a AIHA, ocorre, predominantemente, a produção de anticorpos IgG contra a *band 3*, especialmente direcionados ao *loop 3* extracelular (aa 542-569) (JANVIER et al., 2013; BRANCH, 2023). Notavelmente, em algumas doenças, como câncer colorretal, pode ocorrer a expressão ectópica de *band 3* nas células cancerígenas, resultando em um quadro de AIHA (KAWAMOTO et al., 2019; KITAO et al., 2020). Apesar de não afetarem a expressão de *band 3*, as infecções por *Plasmodium* spp têm a capacidade de desencadear a formação de autoanticorpos contra esta proteína (HOGH et al., 1994; BRAHIMI et al., 2011; MOURÃO et al., 2018; CASTRO-SALGUEDO; MENDEZ-CUADRO; MONERIZ, 2021).

#### **4.1.2. Interações entre *Plasmodium* spp e a proteína *band 3***

O processo de invasão celular por parasitos do gênero *Plasmodium* envolve uma série de interações moleculares, principalmente com proteínas de superfície de eritrócitos. Dentre essas várias proteínas, a *band 3* já foi comprovada como ligante celular para *P. falciparum* (ALMUKADI et al., 2019; GOEL et al., 2003; LI et al., 2004) e também para *P. vivax* (ALAM et al., 2016, 2015; ZEESHAN et al., 2015; DE MEULENAERE et al., 2022; LU et al., 2022).

Acerca das interações de *P. falciparum* com a proteína *band 3*, evidenciou-se que as subunidades PfMSP-142, PfMSP-119 e PfMSP-138, além da PfMSP-9 interagem com um sítio específico (aa 720-761) da proteína durante o processo de invasão celular (GOEL et al., 2003; LI et al., 2004). Esse sítio específico está localizado na porção citoplasmática, entre os TMs 10 e 11 (ARAKAWA et al., 2015), sugerindo que a própria interação parasito-célula é capaz de deformar a proteína e expor possíveis novos epítomos. Uma nova descoberta revela que a PfGAMA (Antígeno micronêmico

ancorado ao GPI de *P. falciparum*) também interage com a *band 3* no processo de invasão celular (LU et al., 2022). Outra interação documentada com a *band 3* é com a PfGARP (Proteína rica em ácido glutâmico de *P. falciparum*) (ALMUKADI et al., 2019). Embora o papel desta última na biologia do parasito ainda não seja completamente esclarecido, há indícios de sua associação com o processo de adesão celular desencadeado por esta espécie (ALMUKADI et al., 2019), indicando que as interações *P. falciparum-band 3* não se limitam ao processo de invasão celular, mas também pode estar associada à virulência do parasito.

Ainda no contexto das infecções causadas por *P. falciparum*, já foi previamente demonstrado que o surgimento de neoantígenos da proteína *band 3* está relacionado à citoaderência desta espécie (CRANDALL; SHERMAN, 1994). Curiosamente, camundongos vacinados com epítomos não modificados da proteína não manifestam reação autoimune, no entanto, após a exposição desses animais a eritrócitos infectados por *P. falciparum*, observou-se o desenvolvimento de anticorpos específicos anti-*band 3* (CRANDALL; SHERMAN, 1994). Essa constatação, entre outras evidências, indica que a infecção por *P. falciparum* é necessária para desencadear a resposta autoimune anti-*band 3* em indivíduos anteriormente saudáveis (HOGH et al., 1994)

Evidenciou-se, no contexto de infecções por *P. vivax*, que diversas proteínas da família PvTRAg (Proteínas ricas em triptofano de *P. vivax*) interagem com a proteína *band 3* durante o processo de invasão celular (ALAM et al., 2016, 2015; ZEESHAN et al., 2015; DE MEULENAERE et al., 2022). Esse dado é notável, pois, na literatura, é amplamente conhecido que *P. vivax* invade reticulócitos por meio de uma única via, a PvDBP-DARC (Duffy binding protein-Duffy antigen/receptor for chemokines) (MILLER et al., 1976). No entanto, essa visão de uma única via já tem sido questionada devido à ocorrência de infecções por *P. vivax* em populações africanas Duffy-negativas, sugerindo a participação de outros receptores nesse processo (MÉNARD et al., 2010), como a proteína *band 3*. *P. vivax* possui 36 proteínas da família PvTRAg, no entanto, apenas 10 possuem a capacidade de se ligar a eritrócitos (ZEESHAN et al., 2015). Dessas, 4 são produzidas durante a fase de esquizonte e 4 durante a fase de “anel”/trofozoíto jovem, sugerindo que as PvTRAGs produzidas primeiramente poderiam estar envolvidas no fenômeno de formação de rosetas, enquanto as produzidas mais tardiamente na vida eritrocítica do parasito poderiam estar associadas à invasão de novos eritrócitos (ZEESHAN et al., 2015; DE MEULENAERE et al., 2022). Além disso, quando há o bloqueio da proteína *band 3* por ação de anticorpos, *P. vivax* não é

capaz de invadir reticulócitos utilizando a via PvTRAg, demonstrando assim outra via de invasão dessa espécie de *Plasmodium* (DE MEULENAERE et al., 2022).

Adicionalmente, foi demonstrado que outra proteína, a PvGAMA, interage com a *band 3* no processo de ligação do parasito aos reticulócitos (LU et al., 2022). A ligação de PvGAMA à proteína pode ser parcialmente bloqueada utilizando anticorpos anti-*band 3*, sugerindo que esta proteína pode ser alvo para novos estudos que busquem novos alvos vacinais capazes de bloquear o processo de invasão do parasito (LU et al., 2022). Infelizmente, devido à dificuldade de cultivar *P. vivax in vitro*, decorrente da sua exclusividade em invadir reticulócitos, ainda há poucas informações sobre as interações das moléculas desse parasito com as moléculas do hospedeiro.

No que concerne à resposta autoimune desencadeada por infecções por *P. vivax*, nosso grupo evidenciou a presença de anticorpos contra essa proteína em pacientes de áreas endêmicas do Brasil (MOURÃO et al., 2018). Recentemente, outro grupo identificou, por meio de ensaios imunoproteômicos, que a proteína *band 3* possui atividade antigênica em reticulócitos infectados por *P. vivax* em pacientes venezuelanos (CASTRO-SALGUEDO; MENDEZ-CUADRO; MONERIZ, 2021). Propôs-se que a resposta a neoantígenos de *band 3*, em áreas de intensa transmissão de malária, estão associados a menores parasitemias e aumento nos sintomas hematológicos através da remoção de eritrócitos saudáveis por autoanticorpos (PANTALEO et al., 2008). Assim, tanto a investigação da interação *P. vivax-band 3* quanto da resposta autoimune, gerada contra essa proteína, são campos que ainda necessitam de mais exploração, podendo contribuir para uma compreensão mais aprofundada da relação parasito-hospedeiro durante a malária vivax.

## 4.2. OBJETIVOS

### 4.2.1. Objetivo geral

Mapear, *in vitro* e *in silico*, os principais epítomos da proteína *band 3* reconhecidos por anticorpos IgG de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax*.

### 4.2.2. Objetivos específicos

- Determinar, *in silico*, os principais epítomos de células B da proteína *band 3* humana e sua conformação estrutural.
- Definir, *in vitro*, quais os principais peptídeos reconhecidos da proteína *band 3* por autoanticorpos de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* através da técnica de *Immunoblot*.
- Sintetizar e testar os peptídeos selecionados em ensaios imunoenzimáticos.

### 4.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.3.1. Predições *in silico* de epítomos de células B e porções transmembrana da proteína *band 3*

Para a predição de epítomos lineares de células B presentes na proteína *band 3* foi inserida a sequência de aminoácidos em formato FASTA (PDB: 4YZF) no *software* BepiPred 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/>). Para validar uma dada região como epítomo linear de células B, neste estudo, o ponto de corte foi estabelecido em 0.5. Para a predição das porções intra, extra e transmembranas dessa proteína, utilizou-se o *software* DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) usando a mesma sequência FASTA como *input*. Toda esta etapa inicial do trabalho foi feito com o auxílio da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liza Figueiredo Felicori Vilela.

#### 4.3.2. *Immunoblot*

A fim de determinar quais eram as principais porções da proteína reconhecidas por autoanticorpos IgG de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax*, sintetizaram-se 224 peptídeos contendo 15 aminoácidos cada e com sobreposição de 4 aminoácidos. Os peptídeos foram sintetizados em membrana de celulose, utilizando-se o aparelho ResPep SL (Intavis Bioanalytical Instruments). Após a síntese, submeteu-se a membrana a um *Immunoblot* no qual, primeiramente, foi bloqueada com uma solução de PBS contendo 5% de BSA e 4% de sacarose por 12 a 16 horas. Na sequência, a membrana foi lavada por três vezes com PBST 0,1%, sob agitação vigorosa, por 10 minutos em cada lavagem. A membrana foi, então, incubada, por 2 horas, com 9 *pools* de contendo 10 plasmas de indivíduos, cada, dos grupos estudados (i) não infectados, ii) infectados por *P. vivax* e sem anemia, iii) infectados por *P. vivax* com anemia). Diluiu-se cada *pool* de plasma na proporção 1:1000 em solução de PBST 0,1%. Após a incubação com os anticorpos, a membrana foi novamente lavada e o anticorpo secundário anti-IgG humano, conjugado à peroxidase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foi adicionado após diluição na proporção 1:10000 em PBST 0,1% e deixou-se incubar por 1 hora. Procedeu-se, então, para outro ciclo de três lavagens. Logo depois, a ligação dos anticorpos foi revelada, por quimioluminescência, utilizando o reagente

Luminata Forte™, e fotodocumentada, no equipamento ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare), após exposição de 30 segundos. Logo após a leitura da membrana, ela era regenerada para que pudesse ser utilizada novamente. Para isso, a membrana foi lavada com 30 mL de dimetilformamida, por 10 minutos, em um ciclo de três lavagens. Após as lavagens, a membrana foi incubada em solução desnaturante (8 M ureia, 1% dodecil sulfato de sódio), por período de 12 a 16 horas. A solução desnaturante, foi, então, trocada e a membrana incubada novamente com esta mesma solução por 30 minutos. Repetiu-se esse processo duas vezes. Transcorrida esta etapa, a membrana foi lavada com 150 mL de água milli-Q, por 2 minutos, e, em seguida, lavada três vezes com solução ácida (55% v/v etanol, 35% v/v água milli-Q, 10% v/v ácido acético glacial) por 10 minutos em cada lavagem. Após esta etapa, a membrana foi lavada novamente por 2 minutos com 150 mL de água milli-Q e, em seguida, lavada mais duas vezes com 50 mL de etanol, por 5 minutos cada. A membrana era, então, colocada sob o fluxo de ar de uma capela química de exaustão até secar e, depois, ser reutilizada ou armazenada, em embalagem apropriada, a 4°C.

#### 4.3.3. Seleção dos peptídeos para a síntese solúvel

Após a obtenção dos valores de densitometria, fez-se a média dos 3 experimentos para cada *pool*. A seleção dos peptídeos para posterior síntese solúvel foi realizada, utilizando-se três critérios: 1- peptídeos mais reativos para anticorpos de indivíduos infectados e anêmicos através da análise utilizando o *cut-off*, que foi calculado através de média somada a dois desvios padrões dos valores de densitometria de *pools* de anticorpos de indivíduos não infectados; 2- peptídeos no qual os *scores* (razão entre reatividade entre dois grupos) era  $\geq 2$ ; 3- peptídeos que estão presentes em alças intracelulares ou que compõem porção correspondente ao canal iônico da proteína *band 3*. Os peptídeos selecionados foram submetidos a uma análise utilizando o *software* BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no modo *blastp* (*Standard Protein BLAST*) de forma a procurar a sequência de aminoácidos destes peptídeos no proteoma de diversos organismos (*Plasmodium* spp, bactérias, fungos, protozoários Apicomplexa e Tripanossomatídeos, helmintos do filo Platyhelminthes e Nematoda).

Para a análise foi excluída a subclasse Mammalia, uma vez que se constatou que a proteína *band 3* possui porções conservadas dentro desta subclasse.

#### 4.3.4. ELISA dos peptídeos selecionados

Após a síntese solúvel dos peptídeos, estes foram ressuspensos em uma solução contendo 20% de dimetilsulfóxido (DMSO). Os peptídeos foram, então, diluídos em PBS 1x na concentração de 1 µg/poço e adicionado às placas de 96 poços por, aproximadamente, 16 horas a 4°C. O procedimento da ELISA para estes antígenos foi realizada de acordo com o descrito no tópico 2.4.2.2.

#### 1.5.6. Análise dos dados

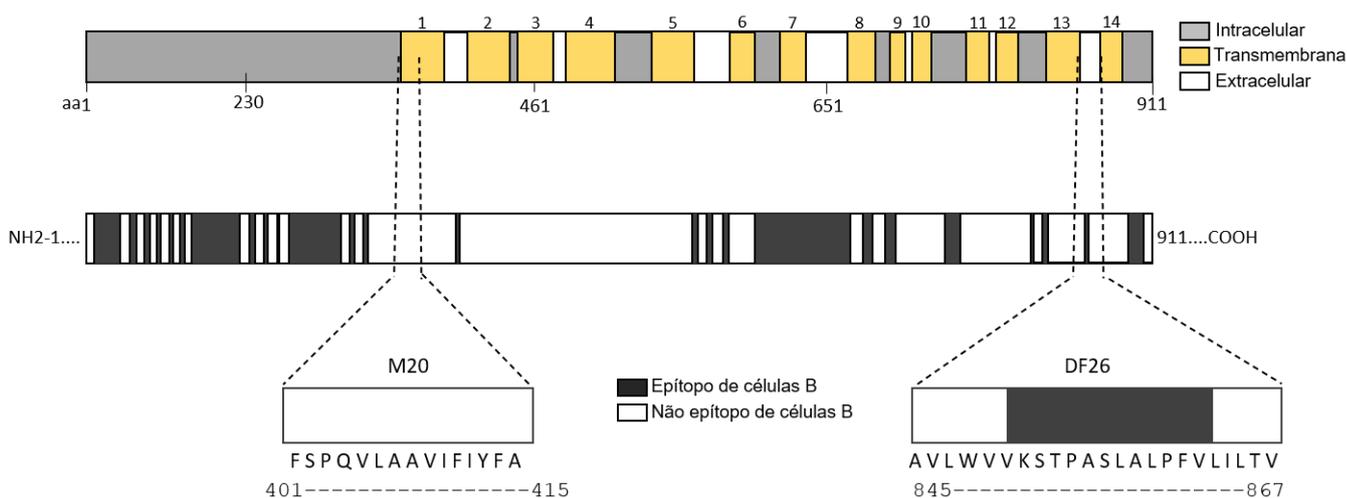
As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* 8.0. Analisou-se normalidade dos dados pelo teste estatístico de Shapiro-Wilk. Para comparar os níveis de anticorpos entre os diferentes grupos estudados, utilizaram-se os testes de *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. As correlações foram analisadas utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson para grupos com distribuição normal e o teste de Spearman para grupos cuja distribuição era não paramétrica.

A análise de densitometria dos *spots* das membranas de *Immunoblot* foram feitas utilizando o programa ImageJ com o *plug-in* Protein Array Analyzer. As análises estruturais dos peptídeos foram feitas no *software* I-TASSER (<https://seq2fun.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>) e a localização destes peptídeos na estrutural tridimensional da proteína *band 3* foi feita utilizando o *software* PyMOL by Schrödinger v2.x.

## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. Predição de epítomos de células B e porções transmembrana da proteína *band 3*

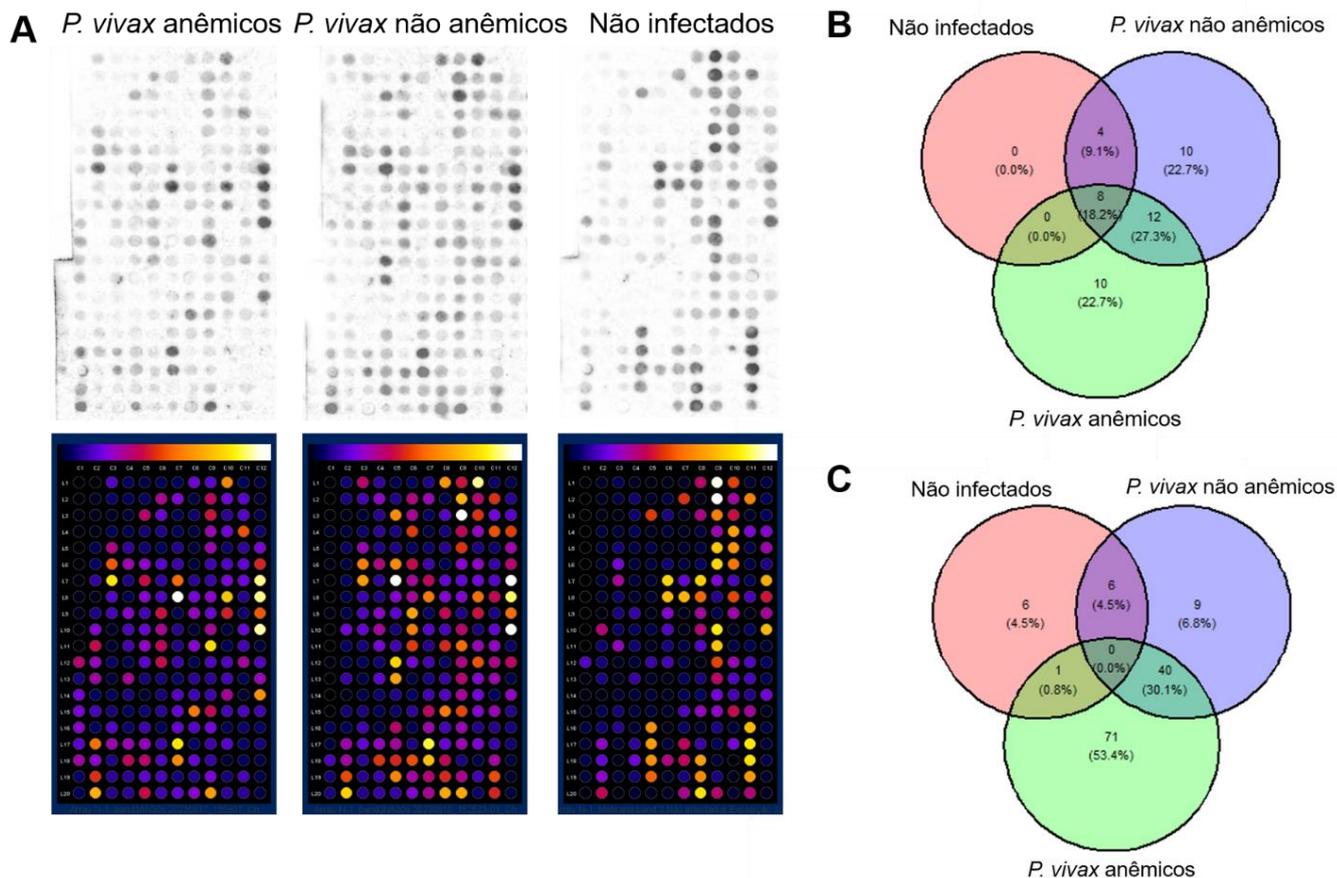
Para determinar os resíduos de aminoácidos importantes para o reconhecimento por anticorpos, fez-se a predição de epítomos lineares de células B, *in silico*, através do *software* BepiPred 2.0, utilizando-se um ponto de corte de 0,5. De acordo com a predição, a proteína *band 3* possui 24 regiões de epítomos (**Figura 30**). Além disso, condizente com dados descritos pela literatura (ARAKAWA et al., 2015), o *software* DeepTMHMM predisse que esta proteína possui 14 porções transmembrana (TM), 8 porções intracelulares (IC) e 8 porções extracelulares (EC). Alinhando as duas predições, podemos verificar que as 13 primeiras regiões antigênicas estão na porção N-terminal da proteína que é inteiramente intracelular e está associada ao citoesqueleto celular. 6 outras regiões são intracelulares e ligam as respectivas porções TM: TM1-2, TM6-7, TM8-9, TM10-11, TM12-13, além de toda a porção C-terminal da proteína. Com relação às porções extracelulares, foi possível verificar que as alças que ligam as porções TM5-6 e TM7-8, além de um único aminoácido que está presente na alça entre as porções TM13-14, correspondem às partes imunogênicas extracelulares da proteína.



**Figura 30 – Predições *in silico* das porções transmembrana e dos epítomos lineares de células B da proteína *band 3*.** A representação da predição conformacional da proteína está representada na parte de cima da Figura 32. As porções transmembrana estão sinalizadas em amarelo, enquanto que as porções intracelulares estão em cinza e as extracelulares em branco. A parte de baixo representa a predição *in silico* de epítomos de células B (em preto) e regiões não preditas estão em branco. Os dois peptídeos selecionados para testes posteriores estão destacados na imagem com seus respectivos epítomos preditos.

#### 4.4.2. Principais peptídeos da proteína *band 3* reconhecidos por autoanticorpos de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax*

As análises do *Immunoblot* com a membrana contendo 224 peptídeos de 15 aminoácidos cada, que cobriam toda a sequência de aminoácidos da proteína *band 3* (PDB: 4YZF), mostraram que ambos os anticorpos provenientes de indivíduos infectados com ou sem anemia são mais reativos, visualmente, aos peptídeos do que aqueles anticorpos provenientes de indivíduos saudáveis (**Figura 31A**). Após o cálculo do valor de *cut-off* ( $\bar{x}$  densitometria indivíduos saudáveis + 2 x desvio padrão), foi possível observar que os anticorpos de indivíduos não infectados não são muito reativos, exclusivamente, a nenhum peptídeo. Por outro lado, os anticorpos provenientes de pacientes infectados por *P. vivax* com e sem anemia reconheceram, intensamente, 10 peptídeos cada. Além de, também, compartilharem o reconhecimento de outros 12 peptídeos. É importante mencionar, também, que pacientes anêmicos e indivíduos saudáveis não compartilham o reconhecimento de nenhum peptídeo. No entanto, 8 peptídeos são reconhecidos pelos 3 grupos estudados e 4 peptídeos foram reconhecidos, concomitantemente, por anticorpos de pacientes não anêmicos e de pessoas não infectadas (**Figura 31B**). Para a análise, considerando os *scores* de cada peptídeo, verificou-se que os pacientes anêmicos reconhecem 71 peptídeos com, pelo menos, o dobro de reatividade que os pacientes não anêmicos e os indivíduos não infectados. Por sua vez, os pacientes não anêmicos reagem mais fortemente a 9 peptídeos, enquanto os indivíduos saudáveis a 6. Os pacientes infectados por *P. vivax* compartilham o reconhecimento de 40 peptídeos, enquanto que aqueles pacientes anêmicos compartilham a reatividade de apenas 1 peptídeo com os indivíduos saudáveis, ao passo que os pacientes não anêmicos compartilham 6 peptídeos com os indivíduos não infectados. Não existe compartilhamento de peptídeos reativos para os 3 grupos concomitantemente (**Figura 31C**).



**Figura 31 – Immunoblot dos peptídeos representativos de toda a sequência de aminoácidos da proteína *band 3* (PDB: 4YZF). A)** Fotografias das membranas de *immunoblot* após exposição por 3 segundos e mapa de calor mostrando a reatividade de cada peptídeo ao *pool* de anticorpos de cada grupo estudado. **B)** Diagrama de Venn com a quantidade e frequência dos peptídeos que reagiram acima do *cut-off*, exclusivamente para cada grupo testado. **C)** Diagrama de Venn com a quantidade e frequência de peptídeos que possuem *scores* de reatividade > 2, exclusivamente para cada grupo testado.

Com base nas análises de *cut-off*, *scores* e, também, baseando-se na predição das porções transmembranas da proteína, selecionamos os peptídeos representados na **Tabela 6** para a síntese solúvel e posteriores testes sorológicos. O peptídeo M20 como um controle, uma vez que é reativo tanto para pacientes anêmicos, como para indivíduos saudáveis. S20 e JK21 por representarem a primeira e a segunda alça extracelular, respectivamente, da proteína, bem como ser reativo para ambos os grupos de indivíduos infectados. H22, embora apresente reatividade apenas para o grupo de indivíduos saudáveis, é o peptídeo que representa uma parte da sequência de aminoácidos da terceira alça extracelular. KL22 por representar o restante da sequência da terceira alça, bem como por ser reativo a ambos os grupos de pacientes infectados por *P. vivax*. I23, embora não seja reativo para nenhum grupo em nenhuma das análises, é um peptídeo que representa a primeira parte da quarta alça extracelular da proteína *band 3*. LO23, peptídeo que continua a sequência da quarta alça extracelular, mas que, é

reativo apenas para indivíduos infectados sem anemia. M26 como representante da porção C-terminal da proteína, que, embora seja inteiramente citoplasmática, demonstrou bastante reatividade, principalmente para anticorpos de pacientes com anemia. É, por fim, o peptídeo DF26 que se mostrou reativo, em ambas as análises, apenas a anticorpos provenientes dos plasmas de indivíduos infectados anêmicos com *P. vivax*. É importante ressaltar que foram feitas junções dos peptídeos J21 e K21 para formar o peptídeo JK21; L23, M23, N23 e O23 para formar o peptídeo LO23; e dos peptídeos D26, E26 e F26 para formar o peptídeo DF26. Essas junções foram realizadas para diminuir o número de peptídeos sintetizados, bem como para abranger partes importantes da proteína que não estavam sendo contempladas nos peptídeos originais, como a lisina 851 no peptídeo F26 (ARAKAWA et al., 2015).

#### 4.4.3. Predição *in silico* de epítomos de células B e alinhamento das sequências dos peptídeos selecionados

A localização de todos os peptídeos selecionados dentro da sequência completa da proteína *band 3* estão representados da **Figura 32**. Como a predição é feita baseando-se na sequência completa da proteína, optou-se por, também, fazer a predição *in silico* de cada peptídeo selecionado como forma de avaliar se eles possuem epítomos próprios, como demonstrado na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Peptídeos selecionados e seus respectivos epítomos preditos *in silico*

Peptídeo	Sequência	Epítomo predito	Epítomo na proteína <i>band 3</i>
M20	FSPQVLA AVIFIYFA	Não possui	Não possui
S20	GLLGEKTRNQM GVSE	EKTRNQM G	EKTRNQM G
JK21	LVFEEAFFSFCETNG LEYI	FCETNG	Não possui
H22	IKIFQDHPLQKTYNY	QDHPLQK	IFQDHPLQKTYNY
KL22	YNYNVLMV PKPQG PLPNTA	QG PL	YNY VPKPQG PLP
I23	QDTYTQKLSV PDGFK	TQKLSV P	QDTYTQKLSV PDGFK
LO23	VSNSSARGWVIHPLGLRSEFP	I – PLGLRS	VSNSSARGWVIHPLGLRSEFP
DF26	AVLWVVKSTPASLALPFVLILTV	VKSTPASLALPFVL	Apenas a segunda alanina
M26	VELQCLDADDAKATF	CLDADDA	VELQCLDADDAKATF

É possível notar que apenas os peptídeos M20 e JK21 não estão em áreas preditas como epítomos de células B pelo *software* BepiPred 2.0. Este perfil se manteve para o peptídeo M20, o qual também não possui epítomos quando analisado individualmente. No entanto, para o peptídeo JK21, observou-se que, ao ser analisado de forma individual, esta molécula possui 6 aminoácidos que compõem um epítomo de células B. Interessantemente, o S20 possui os mesmos aminoácidos considerados epítomos quando na forma individual como inserido na sequência completa da proteína *band* 3. Para os peptídeos I23, LO23 e M26, nota-se que a sequência inteira deles fazem parte de porções imunogênicas da proteína completa, no entanto, seus epítomos individuais são reduzidos a sete aminoácidos cada. Os peptídeos H22 e KL22 se comportam de maneira parecida, tendo um pedaço de sua sequência correspondendo a uma região de epítomos na proteína inteira e tendo seus próprios epítomos formados por sete e quatro aminoácidos, respectivamente. Outro fator importante de mencionar é que apenas a primeira alanina da sequência de aminoácidos do peptídeo DF26 é dita como um epítomo *in silico*, no entanto, esta é a molécula com o maior epítomo predito quando analisada individualmente, com 14 aminoácidos formando sua porção imunogênica.

Realizou-se, pois, um blastp para procurar similaridades das sequências destes peptídeos com o proteoma de organismos, a fim de excluir possíveis reações cruzadas. A **Tabela 7** mostra os quatro alinhamentos mais fortes para cada peptídeo. Com estes dados, é possível observar que a grande maioria das sequências possui alinhamentos com *score* < 40, com apenas um alinhamento com valores de *score* entre 4150. Além disso, as sequências se alinharam mais fortemente a bactérias e fungos não infecciosos para humanos.

**Tabela 7** – Alinhamentos das sequências dos peptídeos com o proteoma de outros organismos

Peptídeo	Organismo	Score	Cobertura		Porcentagem de identidade
			da sequência	E-value	
M20	<i>Candidatus</i>				
	<i>Cloacimonadota</i>	35.8	80%	1.6	83.3%
	<i>bacterium</i>				
	<i>Candidatus</i>				
	<i>Cloacimonadota</i>	35.8	80%	1.6	83.3%
	<i>bacterium</i>				
	<i>Bacterium</i>	35.8	80%	1.6	91.7%

<b>S20</b>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	35.4	73%	2.3	90.9%
	<i>Peptoniphilus</i> sp.	33.7	86%	9.3	84.6%
	<i>Bdellovibrionales bacterium</i>	32.9	86%	19	78.6%
	<i>Bdellovibrionales bacterium</i>	32.9	86%	19	78.6%
	<i>Hymenobacter gilianensis</i>	32	80%	37	83.3%
	<i>Bacterium</i>	38.8	89%	0.29	54.5%
<b>JK21</b>	<i>Nocardiopsis flavescens</i>	37.5	89%	0.81	70%
	<i>Rhizobium</i> sp.	37.1	68%	1.1	76.9%
	<i>Rhizobium/Grupo Agrobacterium</i>	36.3	89%	2.3	60%
	<i>Chloroflexota bacterium</i>	34.6	93%	4.6	73.3%
<b>H22</b>	<i>Prevotelleceae bacterium</i>	33.3	100%	13	68.7%
	<i>Dyadobacter jiangsuensis</i>	33.3	93%	13	71.4%
	<i>Rhabdobacter roseus</i>	33.3	93%	13	71.4%
	<i>Anaerolineales bacterium</i>	37.5	73%	0.81	80%
<b>KL22</b>	<i>Bacterium</i>	34.6	73%	9.1	66.7%
	<i>Bacterium</i>	32.9	73%	36	80%
	<i>Anaerolineales bacterium</i>	32.5	73%	51	73.3%
	<i>Knufia fluminis</i>	34.1	86%	6.6	76.9%
<b>I23</b>	<i>Rhizoctonia solani</i>	32.5	86%	26	76.9%
	<i>Rhizoctonia solani</i>	32.5	86%	26	76.9%
	<i>Rhizoctonia solani</i>	32.5	86%	26	76.9%
	<i>Rhizoctonia solani</i>	32.5	86%	26	76.9%

<b>LO23</b>	<i>Verrucomicrobiae</i> <i>bacterium</i>	36.3	85%	3.1	58.3%
	<i>Bacteroidota</i> <i>bacterium</i>	35.4	90%	6.2	73.7%
	<i>Gordonia</i> <i>westfalica</i>	34.6	71%	12	80%
	<i>Comamonas</i> <i>terrigena</i>	34.1	61%	17	76.9%
<b>DF26</b>	<i>Lactiplantibacillus</i> <i>plantarum</i>	50.7	100%	4e05	69.6%
	<i>Streptomyces</i> sp.	36.7	91%	3.0	71.4%
	<i>Brevundimonas</i> sp.	36.3	56%	4.0	92.3%
	<i>Noviherbaspirillum</i> <i>aridicola</i>	36.3	82%	4.1	70%
<b>M26</b>	<i>Chitinophagales</i> <i>bacterium</i>	34.6	93%	4.7	80%
	<i>Chitinophagales</i> <i>bacterium</i>	34.6	93%	4.7	80%
	<i>Chitinophagales</i> <i>bacterium</i>	34.6	93%	4.7	80%
	<i>Bacteroidaceae</i>	34.6	100%	4.7	60%

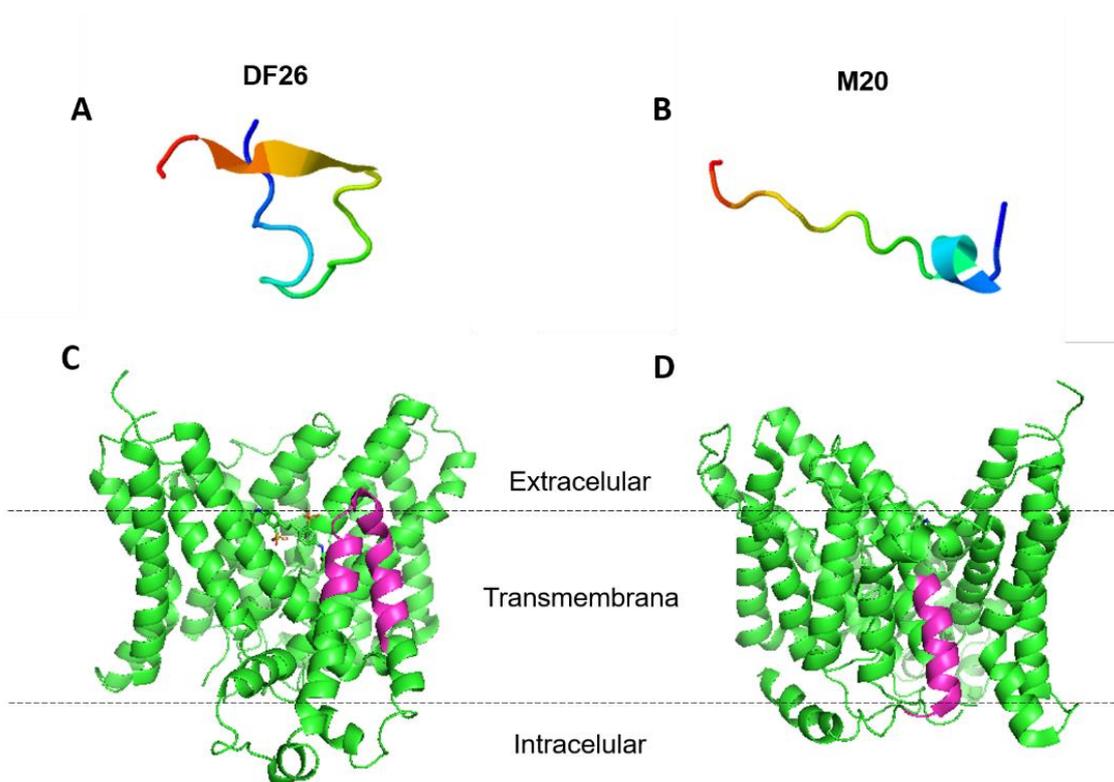
#### 4.4.4. Predição estrutural e localização estrutural dos peptídeos na sequência da proteína *band 3*

Por questões externas, apenas os peptídeos M20 e DF26 foram sintetizados a tempo para a realização de experimentos para esta tese, portanto, a partir deste ponto, apenas estes dois peptídeos serão abordados. Para conferir as propriedades físico-químicas dos peptídeos M20 e DF26 foi utilizado o *software* PepCalc (<https://pepcalc.com/>), e os resultados para cada molécula estão representados na **Tabela 8**.

**Tabela 8** – Propriedades físico-químicas dos dois peptídeos selecionados para a síntese solúvel

<b>Peptídeo</b>	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>Ponto isoelétrico (pH)</b>	<b>Solubilidade em água</b>
<b>M20</b>	1685.01	9.6	Baixa
<b>DF26</b>	2437.01	14	Baixa

Em seguida, fez-se a predição tridimensional de cada peptídeo utilizando o *software* I-TASSER (**Figura 34A,B**), e a localização destes peptídeos na estrutural tridimensional da proteína *band 3* (PDB: 4YZF) foi feita utilizando o *software* PyMOL by Schrödinger v2.x (**Figura 34C,D**). A predição estrutural do peptídeo DF26 apontou que este peptídeo possui suas extremidades N- e C-terminais em folhas- $\beta$ , seguidas por porções em *coil* e dois resíduos de aminoácidos formam uma  $\alpha$ -hélice bem no centro da molécula. Para o peptídeo M20, a predição da estrutura mostrou que a porção N-terminal é formada por  $\alpha$ -hélice até o resíduo cinco e depois possui uma estrutura em folhas- $\beta$  até a C-terminal. Essas predições dos peptídeos isolados são bastante distoantes de como eles estão dispostos naturalmente na proteína, onde eles são, predominantemente, formados por  $\alpha$ -hélices.



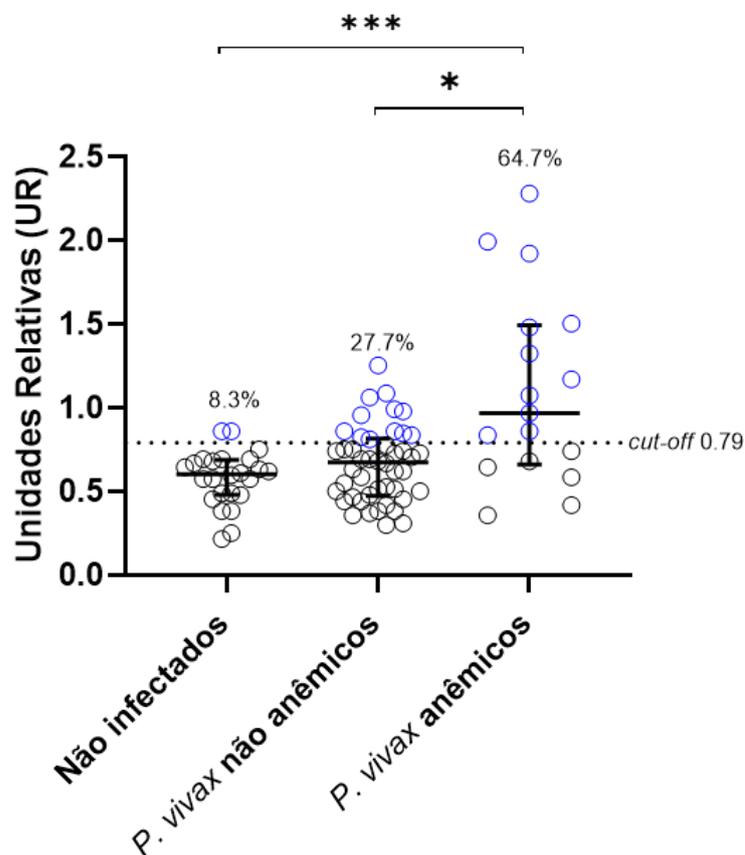
**Figura 32** – Estruturas secundárias preditas dos peptídeos DF26 e M20 e a localização deles na estrutura predita da proteína inteira. **A)** Peptídeo DF26, **B)** Peptídeo M20, **C)** Peptídeo DF26 na proteína *band 3* e **D)** Peptídeo M20 na proteína *band 3*. A estrutura da proteína *band 3* está representada em verde e a localização de cada peptídeo está destacada em rosa. As linhas tracejadas indicam a localização das extremidades da bicamada lipídica da membrana celular de eritrócitos.

#### 4.4.5. ELISA com os peptídeos selecionados e correlações entre parâmetros clínicos e resposta anti-*band 3*

Por questões externas, apenas os peptídeos M20 e DF26 foram sintetizados na forma solúvel e, portanto, apenas os testes imunoenzimáticos destes dois antígenos serão demonstrados a seguir.

A resposta de IgG anti-M20 mostrou-se significativamente aumentada nos pacientes infectados por *P. vivax* apresentando anemia (0,96 [0,66-1,49]) em relação aos pacientes não anêmicos (0,67 [0,47-0,81];  $p = 0,0115$ ) e aos indivíduos não infectados (0,60 [0,48-0,68];  $p = 0,0009$ ) (**Figura 33**). Não houve diferença estatística significativa entre os pacientes com malária vivax e sem anemia e os indivíduos saudáveis. Com relação à frequência de respondedores acima do valor de *cut-off* (0,73), 64,7% dos indivíduos infectados e com anemia apresentaram-se acima do ponto de corte, ao passo

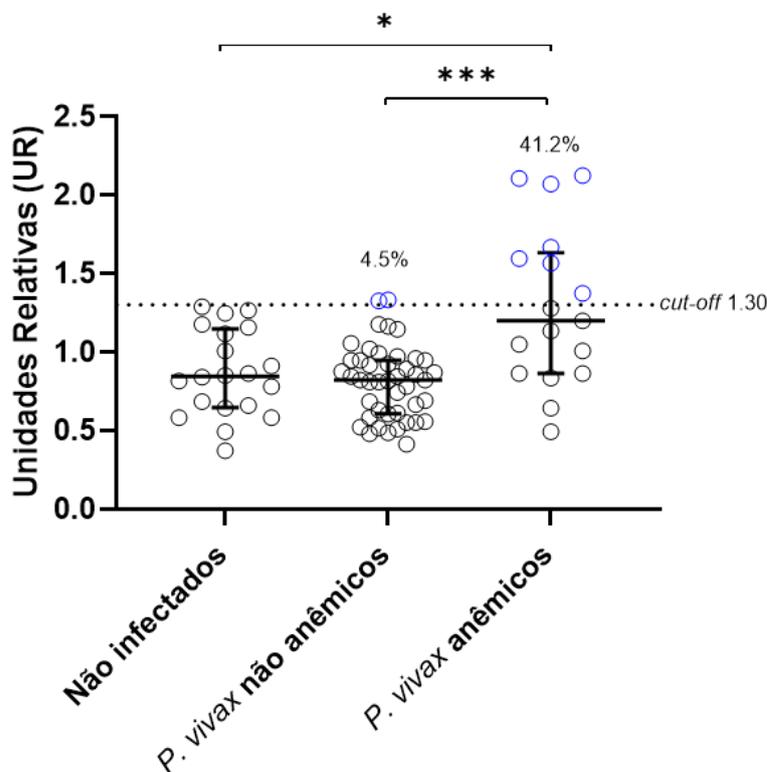
que, para os indivíduos infectados não anêmicos e os indivíduos saudáveis esses valores foram de 27,7% e 8,3%, respectivamente.



**Figura 33 – Resposta de IgG ao peptídeo M20.** A resposta de IgG anti-M20 foi expressa como unidades relativas (UR). A linha central representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). A linha pontilhada indica o valor de *cut-off*. Os indivíduos sinalizados em azul são aqueles que se encontram acima do valor de *cut-off*. As porcentagens acima de cada grupo indicam a frequência de respondedores acima do valor de *cut-off*. Não infectados (n = 24), *P. vivax* não anêmicos (n = 46), *P. vivax* anêmicos (n = 18). Significância estatística foi acessada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e está representada por asteriscos (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

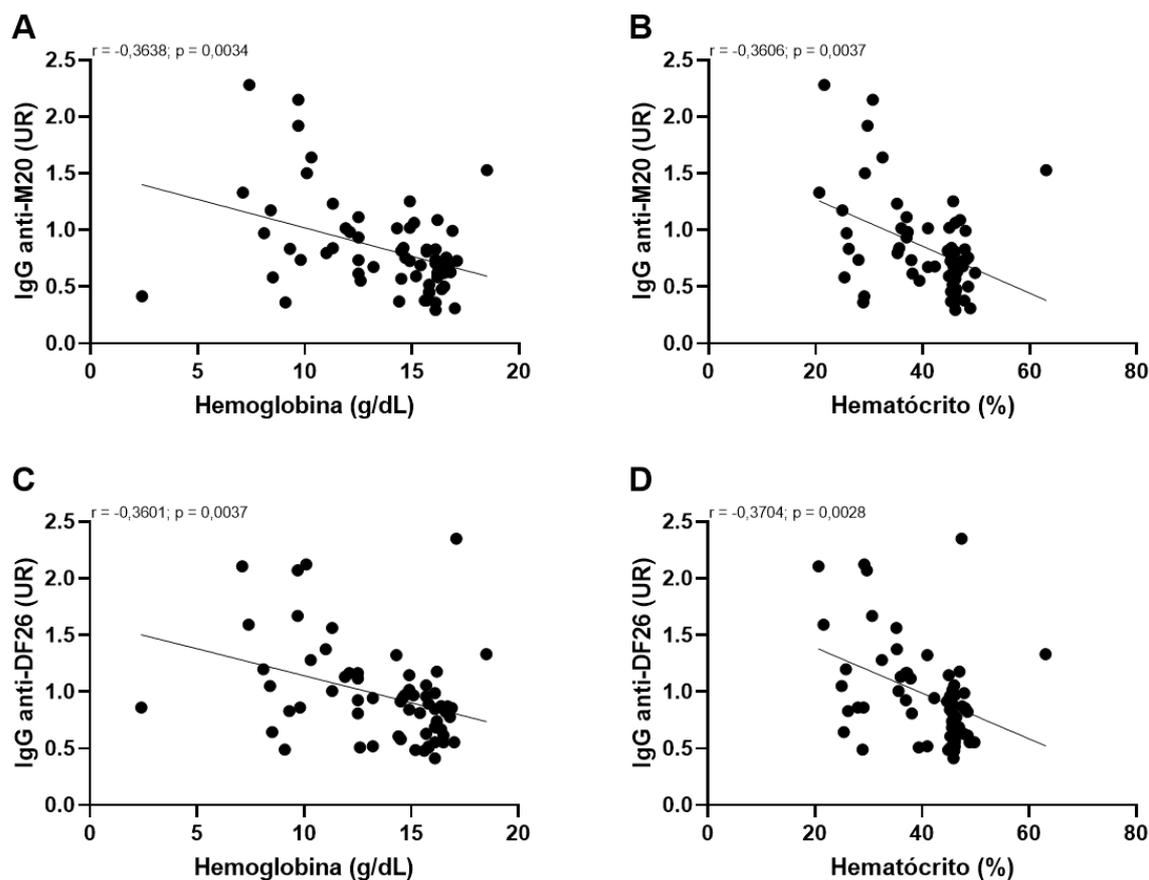
Um perfil parecido de resposta foi observado para o peptídeo DF26. Pacientes com malária vivax e anemia (1,2 [0,86-1,63]) foram significativamente mais reativos a este antígeno do que os pacientes sem anemia (0,82 [0,60-0,94]; p = 0,0009) e os indivíduos não infectados (0,84 [0,64-1,14]; p = 0,0279) (**Figura 34**). Também não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os pacientes que não apresentavam anemia e os doadores saudáveis. Com relação à frequência dos indivíduos considerados forte respondedores (*cut-off* 1,30), foi observado que 41,3% dos pacientes com anemia e

4,5% dos pacientes respondem acima do limiar de corte. Nenhum doador não infectado foi considerado como forte respondedor a este peptídeo.



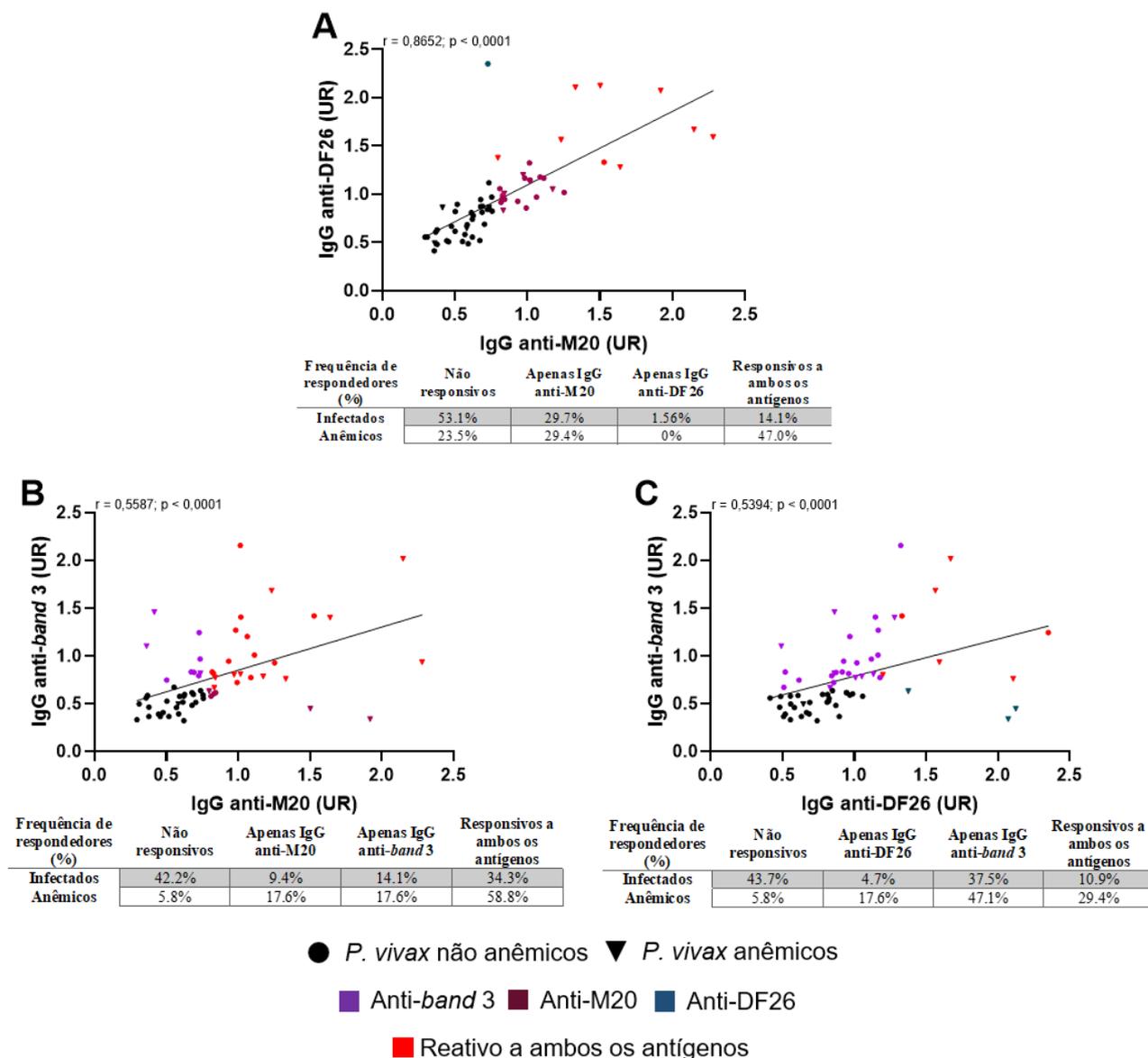
**Figura 34 – Resposta de IgG ao peptídeo DF26.** A resposta de IgG anti-DF26 foi expressa como unidades relativas (UR). A linha central representa as medianas e as barras flutuantes indicam os intervalos interquartis (25%-75%). A linha pontilhada indica o valor de *cut-off*. Os indivíduos sinalizados em azul são aqueles que se encontram acima do valor de *cut-off*. As porcentagens acima de cada grupo indicam a frequência de respondedores acima do valor de *cut-off*. Não infectados (n = 24), *P. vivax* não anêmicos (n = 42), *P. vivax* anêmicos (n = 18). Significância estatística foi acessada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e está representada por asteriscos (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

Com relação às correlações com os parâmetros clínicos, a resposta de anticorpos a peptídeos comportaram-se de forma similar à resposta anti-*band* 3. Houve correlação estatisticamente significativa apenas com os parâmetros indicativos de anemia: níveis de hemoglobina e hematócrito. A resposta anti-M20 correlacionou-se negativamente com os níveis de hemoglobina ( $r = -0,3638$ ;  $p = 0,0034$ ) e com o hematócrito ( $r = -0,3606$ ;  $p = 0,0037$ ) (**Figura 35A,B**). Mesmo perfil observado para a resposta anti-DF26 quando correlacionado com hemoglobina ( $r = -0,3601$ ;  $p = 0,0037$ ) e hematócrito ( $r = -0,3704$ ;  $p = 0,0028$ ) (**Figura 35C,D**). Nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada entre a resposta anti ambos os peptídeos e os demais parâmetros avaliados.



**Figura 35 – Correlação entre a resposta de IgG anti-M20 e anti-DF26 e parâmetros hematológicos.** A,C) nível de hemoglobina, B,D) hematócrito. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos

As respostas contra ambos os peptídeos correlacionaram-se fortemente entre si ( $r = 0,8652$ ;  $p > 0,0001$ ) com uma predominância da resposta anti-M20 sobre a resposta anti-DF26 (**Figura 36A**). A correlação direta da resposta de IgG anti-M20 e anti-*band 3* foi estatisticamente significativa ( $r = 0,5587$ ;  $p < 0,0001$ ) e a resposta a ambos antígenos foi similar quando os pacientes foram comparados individualmente, com uma leve predominância da resposta anti-*band 3* quando todos os indivíduos infectados foram considerados na análise (**Figura 36B**). A resposta anti-DF26 também se correlacionou positivamente com a resposta anti-*band 3* ( $r = 0,5394$ ;  $p < 0,0001$ ), no entanto, houve um predomínio da resposta anti-*band 3*, tanto para o total de pacientes infectados quanto para aqueles que apresentaram anemia (**Figura 36C**). Nenhum indivíduo infectado sem anemia mostrou-se um alto respondedor apenas ao peptídeo DF26. De forma interessante, os três indivíduos anêmicos, que foram responsivos exclusivamente ao peptídeo DF26, são os mesmos que foram exclusivamente responsivos ao M20.



**Figura 36 – Correlações entre a resposta de IgG contra os peptídeos testados e a resposta anti-band 3. A) M20 x DF26 B) M20 x band 3 e C) DF26 x band 3.** As tabelas abaixo dos gráficos indicam a frequência de respondedores acima dos valores de *cut-off* para a totalidade de indivíduos infectados e para aqueles que se apresentavam anêmicos. As cores indicadas na legenda da imagem indicam aqueles indivíduos que reagiram acima do valor do *cut-off* para um ou ambos os antígenos. As bolas representam os indivíduos infectados por *P. vivax* não anêmicos e os triângulos invertidos representam aqueles infectados por *P. vivax* e com anemia. Correlações foram feitas utilizando o teste de correlação de Spearman, seguido de uma regressão linear. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.5. DISCUSSÃO

Ao longo de sua vida útil, o eritrócito enfrenta diversos processos estressantes que, gradualmente, “marcam” a célula para remoção. Entre essas alterações, destacam-se a perda de membrana, que resulta em menor deformabilidade, a oxidação das proteínas de membrana, a exposição de PS, mudanças enzimáticas e a formação de neoantígenos (ou antígenos de senescência) na superfície, especialmente da proteína *band 3* (THIAGARAJAN; PARKER; PRCHAL, 2021). Para que esse processo ocorra, a hemoglobina sofre desnaturação devido ao estresse oxidativo, gerando hemicromos que se acumulam no citoplasma e se polimerizam ao domínio citoplasmática da *band 3*, formando um agregado insolúvel (LOW et al., 1985; PANTALEO et al., 2008). Essa oxidação é responsável por expor os neoantígenos, que são reconhecidos por autoanticorpos naturais, promovendo assim a remoção dessas células pelos macrófagos residentes do baço (KAY, 1975; KAY et al., 1983). Além disso, a formação desses antígenos de senescência pode também originar-se de processos proteolíticos resultantes da clivagem da *band 3* (KAY; GOODMAN, 1984).

Além destes anticorpos direcionados à *band 3*, postula-se que anticorpos antigalactosil, naturalmente presentes, também se liguem a esses antígenos crípticos expostos durante o envelhecimento celular (GALILI et al., 1986). No entanto, a ausência de alterações na depuração de eritrócitos em camundongos agamaglobulinêmicos levanta questionamentos sobre a significância fisiológica da remoção de eritrócitos senescentes mediada por anticorpos (CONNOR; PAK; SCHROIT, 1994; BRATOSIN et al., 2002; HUDSON et al., 2017).

O aparecimento de neoantígenos é uma estratégia do sistema imunológico de aumentar e intensificar a resposta a um patógeno, de forma a rapidamente se livrar da infecção, no entanto, pode ser um mecanismo que beneficia o patógeno, uma vez que cria anticorpos inespecíficos que possuem, como alvo, moléculas próprias do hospedeiro (SUNDARESAN et al., 2023). Estes epítomos crípticos são incapazes de interagir com anticorpos em condições fisiológicas, no entanto, a partir de mudanças conformacionais, autoanticorpos inespecíficos começam a reconhecer esses sítios (POWELL; BLACK, 2001; CORNABY et al., 2015) e a consequentemente gerar respostas imunes autorreativas.

Neste estudo, mostramos a formação de neoantígenos da *band 3* em eritrócitos saudáveis durante infecção por *P. vivax*. Essa informação é evidenciada pelo número de peptídeos exclusivamente reconhecidos por anticorpos do plasma de indivíduos infectados – tanto para a análise utilizando *cut-off*, como para a utilizando os *scores* de reatividade – especialmente daqueles pacientes que possuíam quadro anêmico no momento da coleta. As análises *in silico* reforçam esse resultado, mostrando que muitos desses peptídeos não estão em áreas consideradas epítomos, mas foram reativos aos anticorpos de indivíduos anêmicos. É importante ressaltar que a técnica de *SPOT synthesis* fornece peptídeos com epítomos lineares e que podem não corresponder ao epítomos *in natura* da proteína mãe (FORSSTRÖM et al., 2015).

Sabe-se que infecções por *P. falciparum* geram resposta a neoantígenos da proteína *band 3* (HOGH et al., 1994). No entanto, essa resposta parece estar associada à região de transmissão intensa de malária, em que os indivíduos possuem baixas parasitemias. De maneira semelhante ao que ocorre naturalmente, nos eritrócitos infectados, há a formação dos hemicromos e a subsequente opsonização por anticorpos anti-*band 3* (GIRIBALDI et al., 2001). O desenvolvimento intracelular de *P. falciparum* é capaz de expor neoantígenos da proteína *band 3* através de mudanças conformacionais (WINOGRAD; SHERMAN, 2004). Curiosamente, essas mudanças ocorrem no sítio já descrito como o formador do antígeno de senescência (KAY; MARCHALONIS, 1991), além de ocorrerem em regiões da proteína que se ligam à trombospondina, responsável pela adesão de eritrócitos ao endotélio (WINOGRAD; PRUDHOMME; SHERMAN, 2005). Interessantemente, nenhum dos peptídeos reconhecidos no ensaio de *Immunoblot* correspondem às porções da proteína que compõem o antígeno de senescência (KAY; MARCHALONIS, 1991; BADIOR; CASEY, 2021), sugerindo que infecções entre diferentes espécies de *Plasmodium* geram interações e, consequentemente, formações de neoantígenos da proteína *band 3* diferentes.

Alguns estudos estabelecem as interações de *P. vivax* com a proteína *band 3* (ALAM et al., 2016, 2015; DE MEULENAERE et al., 2022; LU et al., 2022; ZEESHAN et al., 2015). No entanto, pouco ainda se sabe se essa espécie é capaz de deformar a proteína de maneira semelhante à *P. falciparum*, expondo neoantígenos da proteína que podem ser reconhecidos por células do sistema imune e acabarem desencadeando uma resposta autoimune. Contudo, sabidamente *P. vivax* necessita da interação com a *band 3* durante o processo de reconhecimento celular e posterior invasão, principalmente em comunidades onde a prevalência de indivíduos Duffy-

negativos é alta (ALAM et al., 2015; 2016). O presente trabalho e outro prévio do nosso grupo de pesquisa (MOURÃO et al., 2018), evidenciam o aparecimento de anticorpos anti-*band 3* em infecções por *P. vivax*. Além disso, esses anticorpos já foram evidenciados como indutores de fagocitose e capazes de promover o enrijecimento de eritrócitos não infectados (MOURÃO et al., 2016). Juntos, esses achados fortalecem a hipótese de formação de novos antígenos durante infecções por *P. vivax* e que anticorpos direcionados a estas porções da proteína poderiam estar associadas ao quadro anêmico apresentado por alguns indivíduos.

Inicialmente concebida como uma técnica para estudos sistemáticos sobre eventos de reconhecimento no sistema imunológico, a técnica de *SPOT synthesis* ainda é principalmente utilizada para este fim. No entanto, seu uso tem sido ampliado para examinar diversos aspectos do fenômeno de reconhecimento molecular, como ligante-receptor, proteína-peptídeo, proteína-proteína, entre outros (CAMPOS et al., 2023; FRANK, 2002). Além disso, é uma técnica que nos permite explorar epítomos que naturalmente estariam escondidos devido a conformação da proteína ou onde ela se encontra, não sendo possível detectar resposta imune contra essa porção. No entanto, esse tipo de técnica nos fornece apenas resultados semi-quantitativos, sendo necessário realizar estudos quantitativos com os peptídeos selecionados para validar e complementar os resultados obtidos (KATZ et al., 2011). Por conta disso, decidimos sintetizar dois peptídeos solúveis.

O reconhecimento de epítomos “crípticos” é evidenciado não apenas nos ensaios de *Immunoblot*, mas também na resposta ao peptídeo M20. Este é um peptídeo cuja a sequência encontra-se integralmente na porção intracelular da proteína (ARAKAWA et al., 2015), no entanto, provoca uma resposta acentuada em indivíduos infectados, especialmente naqueles que apresentam quadro anêmico. Curiosamente, a porção em que esse peptídeo se encontra na *band 3* não foi predita como um epítomo de células B e nem sua sequência isolada compõe um epítomo. A presença da infecção por *P. vivax* pode gerar, então, um espalhamento de epítomos intramolecular, onde há a formação de neoantígenos dentro de uma mesma proteína (MÜNZ et al., 2009). O espalhamento de epítomos é, geralmente, uma estratégia do sistema imune para combater um patógeno; no entanto, esse fenômeno pode levar o surgimento de doenças ou quadro autoimunes, uma vez que esse espalhamento de epítomos não é específico e não ocorre em uma única proteína (VANDERLUGT; MILLER, 2002; MÜNZ et al., 2009; SULIMAN, 2024).

As respostas de anticorpos aos dois peptídeos solúveis de mostraram semelhante à resposta anti-*band 3*. Embora a frequência de respondedores acima dos valores de *cut-off* evidencia que existem outras porções da proteína que são significativamente reconhecidas. No entanto, é necessário sintetizar outros peptídeos selecionados para termos mais confiabilidade em qual ou quais são essas porções e a quão significativa elas são o reconhecimento da proteína. E, posteriormente, ensaios funcionais devem ser realizados para verificar se esses epítomos são funcionais para induzir fagocitose ou outra resposta celular que poderia auxiliar na remoção de eritrócitos não infectados. Curiosamente, o peptídeo DF26 compreende uma porção presente na face externa da proteína e que serve de sítio de ligação para o H<sub>2</sub>DIDS (ARAKAWA et al., 2015). Aliadas, essas informações sugerem que anticorpos contra essa porção poderiam estar envolvidos no interrompimento do fluxo de íons do canal iônico da proteína, contribuindo assim para o enrijecimento da membrana e remoção por macrófagos (MOURÃO et al., 2016). No entanto, essa hipótese ainda merece mais atenção em estudos futuros.

Para excluir a possibilidade de mimetismo molecular de proteínas de *P. vivax* ou de outros patógenos com a *band 3*, foi feita a análise utilizando o BLAST®, evidenciando que nenhuma sequência dos peptídeos selecionados se alinha com proteínas do hospedeiro ou de outros agentes patogênicos. Esses resultados são reforçados por dados posteriores do nosso grupo de pesquisa, no qual evidenciou que 23 proteínas de *P. vivax* são miméticas a proteínas humanas, mas nenhuma delas é a *band 3* (MOURÃO et al., 2018). Esses dados intensificam as evidências de que a formação de neoantígenos pode ser o principal fator do surgimento da resposta anti-*band 3* em infecções por *P. vivax* e que esse fenômeno ocorra devido à interação de proteínas do parasito com a *band 3*, provocando a deformabilidade dessa proteína e expondo antígenos “crípticos” (ALAM et al., 2015; 2016; ZEESHAN et al., 2015; DE MEULENAERE et al., 2022; LU et al., 2022).

Portanto, esse estudo acrescenta informações importantes para o entendimento da resposta autoimune e o surgimento de neoantígenos em proteínas próprias do hospedeiro durante um processo infeccioso. Estudos que visem identificar o verdadeiro papel efetor desses anticorpos, bem como o papel deles no bloqueio dos canais iônicos, ainda são necessários e fundamentais para elucidar como essas moléculas contribuem para o quadro anêmico em indivíduos infectados por *P. vivax*.

## 5. CONCLUSÕES

- Anticorpos anti-*band 3* parecem ser os principais responsáveis pela opsonização de eritrócitos não infectados;
- Análises *in vitro* e *in silico* mostraram que anticorpos anti-*band 3* de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* reconhecem epítomos não preditos e de regiões da proteína que não são naturalmente expostas;
- Os peptídeos M20 e DF26 parecem promissores para o entendimento do espalhamento de epítomos e os neoantígenos da *band 3*, formados durante a infecção por *P. vivax*;
- A relação do peptídeo DF26 e o bloqueio do canal iônico da proteína *band 3* ainda devem ser melhor explorados.

## 6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este estudo representa um avanço no entendimento dos autoanticorpos durante as infecções por *P. vivax*. Este foi o primeiro trabalho, documentado, que utilizou uma análise multivariada entre os diferentes autoanticorpos dosados para avaliar a resposta autoimune durante infecções por *P. vivax*. Esta é uma abordagem robusta, pois permite avaliar a resposta de autoanticorpos como um todo, sem estar compartimentalizada. Além disso, pela primeira vez, também foi utilizada a técnica de *SPOT synthesis* para a proteína *band 3*. Demonstrou-se aqui que a *band 3* parece ser um dos principais alvos, senão o principal, para esses anticorpos na superfície dos eritrócitos. Além disso, levanta-se a possibilidade plausível de exposição de neoantígenos da proteína durante a infecção; no entanto, essa hipótese necessita de uma exploração mais aprofundada em futuras pesquisas. Como próximos passos, planejamos identificar os padrões de glicosilação da porção Fc desses anticorpos e associá-los a ensaios funcionais que utilizam monócitos ativados de diferentes maneiras e também células T. Isso nos permitirá obter evidências sobre quais mecanismos estão envolvidos na remoção de eritrócitos não infectados por meio do reconhecimento de antígenos da *band 3*.

## REFERÊNCIAS

- AASHISH, A.; MANIGANDAN, G. Complicated vivax malaria, an often underestimated condition - Case Report. **Journal of Family & Community Medicine**, v. 22, n. 3, p. 180–182, 2015.
- ADEKUNLE, A. I. et al. Modeling the Dynamics of *Plasmodium vivax* Infection and Hypnozoite Reactivation In Vivo. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003595, 17 mar. 2015.
- ALAM, M. S. et al. Host–parasite interaction: multiple sites in the *Plasmodium vivax* tryptophan-rich antigen Pv TRA g38 interact with the erythrocyte receptor band 3. **FEBS Letters**, v. 590, n. 2, p. 232–241, jan. 2016.
- ALAM, MOHD. S. et al. Interaction of *Plasmodium vivax* Tryptophan-rich Antigen PvTRAg38 with Band 3 on Human Erythrocyte Surface Facilitates Parasite Growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 33, p. 20257–20272, ago. 2015.
- ALEXANDRE, M. A. et al. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1611–1614, out. 2010.
- ALLHORN, M. et al. The IgG-specific endoglycosidase EndoS inhibits both cellular and complement-mediated autoimmune hemolysis. **Blood**, v. 115, n. 24, p. 5080, 6 jun. 2010.
- ALMUKADI, H. et al. Human erythrocyte band 3 is a host receptor for *Plasmodium falciparum* glutamic acid–rich protein. **Blood**, v. 133, n. 5, p. 470–480, 31 jan. 2019.
- ALVAREZ, B. V. et al. Cardiac hypertrophy in anion exchanger 1-null mutant mice with severe hemolytic anemia. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 3, p. H1301-1312, mar. 2007.
- AMBEGAONKAR, A. A. et al. Expression of inhibitory receptors by B cells in chronic human infectious diseases restricts responses to membrane-associated antigens. **Science Advances**, v. 6, n. 30, p. eaba6493, jul. 2020.
- ANDRADE, B. B. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 13, dez. 2010.
- ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 5, p. 220–227, 1 maio 2009.
- ANTONELLI, L. R. et al. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 163–189, jan. 2020.
- ANTONELLI, L. R. V. et al. The CD14+CD16+ Inflammatory Monocyte Subset Displays Increased Mitochondrial Activity and Effector Function During Acute *Plasmodium vivax* Malaria. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 9, p. e1004393, 18 set. 2014.

- ARAKAWA, T. et al. Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. **Science (New York, N.Y.)**, v. 350, n. 6261, p. 680–684, 6 nov. 2015.
- ARASHIKI, N. et al. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. **Biochemistry**, v. 52, n. 34, p. 5760–5769, 27 ago. 2013.
- ARÉVALO-HERRERA, M. et al. Identification of HLA-A2 restricted CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte responses to *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein in individuals naturally exposed to malaria. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 3, p. 161–169, mar. 2002.
- ATAM, V. et al. Acute pancreatitis and acute respiratory distress syndrome complicating *Plasmodium vivax* malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 50, n. 2, p. 151–154, 2013.
- BADIOR, K. E.; CASEY, J. R. Large conformational dynamics in Band 3 protein: Significance for erythrocyte senescence signalling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1863, n. 10, p. 183678, out. 2021.
- BAKER, V. S. et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 41, dez. 2008.
- BARBER, B. E. et al. Antiphosphatidylserine Immunoglobulin M and Immunoglobulin G Antibodies Are Higher in Vivax Than Falciparum Malaria, and Associated With Early Anemia in Both Species. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 9, p. 1435–1443, 26 set. 2019.
- BARGIERI, D. et al. Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: The Junction Conundrum. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 9, p. e1004273, 18 set. 2014.
- BARO, B. et al. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005365, 6 abr. 2017.
- BENNETT, V.; STENBUCK, P. J. The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. **Nature**, v. 280, n. 5722, p. 468–473, 9 ago. 1979.
- BERI, D.; BALAN, B.; TATU, U. Commit, hide and escape: the story of *Plasmodium* gametocytes. **Parasitology**, v. 145, n. 13, p. 1772–1782, nov. 2018.
- BERTOCCHIO, J.-P. et al. Red Blood Cell AE1/Band 3 Transports in Dominant Distal Renal Tubular Acidosis Patients. **Kidney International Reports**, v. 5, n. 3, p. 348–357, mar. 2020.
- BERZINS, K.; WAHLGREN, M.; PERLMANN, P. Studies on the specificity of anti-erythrocyte antibodies in the serum of patients with malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 54, n. 2, p. 313–318, nov. 1983.

- BESTEIRO, S.; DUBREMETZ, J.-F.; LEBRUN, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion: The moving junction of apicomplexan parasites. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 797–805, jun. 2011.
- BILGIN, R. et al. Oxidative Stress in Vivax Malaria. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 50, n. 4, p. 375–377, 26 nov. 2012.
- BLOCH, E. M. et al. Differential red blood cell age fractionation and Band 3 phosphorylation distinguish two different subtypes of warm autoimmune hemolytic anemia. **Transfusion**, v. 60, n. 8, p. 1856–1866, ago. 2020.
- BOODHOO, A.; REITHMEIER, R. A. Characterization of matrix-bound Band 3, the anion transport protein from human erythrocyte membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 2, p. 785–790, 25 jan. 1984.
- BOONPUCKNAVIG, S. Autoantibodies in sera of Thai patients with *Plasmodium falciparum* infection. 1984.
- BRAGA, É. M.; FONTES, C. J. |F.; KRETTLI, A. U. Persistence of Humoral Response against Sporozoite and Blood-Stage Malaria Antigens 7 Years after a Brief Exposure to *Plasmodium vivax*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 4, p. 1132–1135, abr. 1998.
- BRAHIMI, K. et al. Monoclonal auto-antibodies and sera of autoimmune patients react with *Plasmodium falciparum* and inhibit its in vitro growth. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 44–51, ago. 2011.
- BRANCH, D. R. Warm autoimmune hemolytic anemia: new insights and hypotheses. **Current Opinion in Hematology**, v. 30, n. 6, p. 203–209, nov. 2023.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017.
- BRATOSIN, D. et al. Flow cytometric approach to the study of erythrophagocytosis: evidence for an alternative immunoglobulin-independent pathway in agammaglobulinemic mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1–2, p. 133–143, 1 jul. 2002.
- BRITO, M. A. M. et al. Morphological and Transcriptional Changes in Human Bone Marrow During Natural *Plasmodium vivax* Malaria Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 7, p. 1274–1283, 1 abr. 2022.
- BUENO, L. L. et al. Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-119 on the innate immune response. **Vaccine**, v. 26, n. 9, p. 1204–1213, fev. 2008.
- CABANTCHIK, Z. I.; ROTHSTEIN, A. Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. I. Localization of disulfonic stilbene binding sites in proteins involved in permeation. **The Journal of Membrane Biology**, v. 15, n. 3, p. 207–226, 1974.

CAMPOS, P. C. et al. Mapping possible interaction sites for crotoxin in CNF, a gamma PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* rattle snake, using SPOT synthesis. **Toxicon**, v. 234, p. 107267, out. 2023.

CARLINI, M. E.; WHITE, A. C.; ATMAR, R. L. Vivax malaria complicated by adult respiratory distress syndrome. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 28, n. 5, p. 1182–1183, maio 1999.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, n. 2, p. 114–123, jun. 1997.

CARTER, R.; NIJHOUT, M. M. Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites. **Science (New York, N.Y.)**, v. 195, n. 4276, p. 407–409, 28 jan. 1977.

CASSIANO, G. C. et al. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N-terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 306, dez. 2016.

CASTRO-GOMES, T. et al. Potential Immune Mechanisms Associated with Anemia in *Plasmodium vivax* Malaria: a Puzzling Question. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 10, p. 3990–4000, out. 2014.

CASTRO-SALGUEDO, C.; MENDEZ-CUADRO, D.; MONERIZ, C. Erythrocyte membrane proteins involved in the immune response to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection. **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1789–1797, maio 2021.

CHAKRAVARTY, S. et al. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1035–1041, set. 2007.

CHANG, K.-H.; STEVENSON, M. M. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 13–14, p. 1501–1516, dez. 2004.

CHEN, P.-L. et al. Erythroid anion Exchanger-1 (band 3) transports nitrite for nitric oxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 210, p. 237–245, jan. 2024.

CHORA, Â. F.; MOTA, M. M.; PRUDÊNCIO, M. The reciprocal influence of the liver and blood stages of the malaria parasite's life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 52, n. 11, p. 711–715, out. 2022.

CLARK, I. A. et al. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 1–2, p. 67–81, jan. 2008.

CLARK, M. A. et al. *Plasmodium vivax* infection compromises reticulocyte stability. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1629, 12 mar. 2021.

COCKBURN, I. A. et al. A simple method for accurate quantification of complement receptor 1 on erythrocytes preserved by fixing or freezing. **Journal of Immunological Methods**, 2002.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M.; ROBERTS, J. M. A RETROSPECTIVE EXAMINATION OF ANEMIA DURING INFECTION OF HUMANS WITH *PLASMODIUM VIVAX*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 410–412, 1 abr. 2003.

CONNOR, J.; PAK, C. C.; SCHROIT, A. J. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 4, p. 2399–2404, 28 jan. 1994.

CORDAT, E.; REITHMEIER, R. A. F. Chapter One - Structure, Function, and Trafficking of SLC4 and SLC26 Anion Transporters. Em: BEVENSEE, M. O. (Ed.). **Current Topics in Membranes**. Exchangers. [s.l.] Academic Press, 2014. v. 73p. 1–67.

CORNABY, C. et al. B cell epitope spreading: mechanisms and contribution to autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 56–68, jan. 2015.

COWMAN, A. F. et al. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, out. 2016.

COX-SINGH, J. et al. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 165–171, 15 jan. 2008.

CRANDALL, I.; SHERMAN, I. W. Cytoadherence-related neoantigens on *Plasmodium falciparum* (human malaria)-infected human erythrocytes result from the exposure of normally cryptic regions of the band 3 protein. **Parasitology**, v. 108 ( Pt 3), p. 257–267, abr. 1994.

CUSICK, M. F.; LIBBEY, J. E.; FUJINAMI, R. S. Molecular Mimicry as a Mechanism of Autoimmune Disease. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 42, n. 1, p. 102–111, fev. 2012.

DANIEL-RIBEIRO, C. et al. Specificity of auto-antibodies in malaria and the role of polyclonal activation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 185–188, jan. 1983.

DAS, S. et al. Processing of Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 4, p. 433–444, out. 2015.

DE FRANCESCHI, L. et al. Membrane cation and anion transport activities in erythrocytes of hereditary spherocytosis: effects of different membrane protein defects. **American Journal of Hematology**, v. 55, n. 3, p. 121–128, jul. 1997.

- DE FRANCESCHI, L. et al. Decreased band 3 anion transport activity and band 3 clusterization in congenital dyserythropoietic anemia type II. **Experimental Hematology**, v. 26, n. 9, p. 869–873, ago. 1998.
- DE MEULENAERE, K. et al. Band 3–mediated *Plasmodium vivax* invasion is associated with transcriptional variation in PvTRAg genes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1011692, 30 set. 2022.
- DE NIZ, M. et al. *Plasmodium* gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. **Science Advances**, v. 4, n. 5, p. eaat3775, 4 maio 2018.
- DEROOST, K. et al. The immunological balance between host and parasite in malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 2, p. 208–257, 1 mar. 2016.
- DONATI, D. et al. Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5412–5418, set. 2004.
- DOUGLAS, N. M. et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 135, dez. 2012.
- DRYSDALE, M. et al. *Plasmodium vivax* in Children: Hidden Burden and Conspicuous Challenges, a Narrative Review. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 12, n. 1, p. 33–51, jan. 2023.
- DUMARCHEY, A.; LAVAZEC, C.; VERDIER, F. Erythropoiesis and Malaria, a Multifaceted Interplay. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12762, 23 out. 2022.
- DUONG, M. C. et al. Magnitude and patterns of severe *Plasmodium vivax* monoinfection in Vietnam: a 4-year single-center retrospective study. **Frontiers in Medicine**, v. 10, p. 1128981, 30 maio 2023.
- ELKON, K. B.; SILVERMAN, G. J. Naturally occurring autoantibodies to apoptotic cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 750, p. 14–26, 2012.
- EREL, O. et al. Oxidative Stress and Antioxidative Status of Plasma and Erythrocytes in Patients with Vivax Malaria. **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 631–639, dez. 1997.
- FACER, C. A. Direct antiglobulin reactions in Gambian children with *P. falciparum* malaria. III. Expression of IgG subclass determinants and genetic markers and association with anaemia. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 41, n. 1, p. 81–90, jul. 1980.
- FACER, C. A.; AGIOSTRATIDOU, G. High levels of anti-phospholipid antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* and in *P. vivax* malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 95, n. 2, p. 304–309, fev. 1994.
- FENDEL, R. et al. Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. **PloS One**, v. 5, n. 4, p. e10038, 6 abr. 2010.

FERNANDES, A. A. M. et al. Similar Cytokine Responses and Degrees of Anemia in Patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Infections in the Brazilian Amazon Region. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 4, p. 650–658, abr. 2008.

FERNANDEZ-ARIAS, C. et al. Anti-Self Phosphatidylserine Antibodies Recognize Uninfected Erythrocytes Promoting Malarial Anemia. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 2, p. 194–203, fev. 2016.

FERRU, E. et al. Thalassemic erythrocytes release microparticles loaded with hemichromes by redox activation of p72Syk kinase. **Haematologica**, v. 99, n. 3, p. 570–578, mar. 2014.

FIGUEIREDO, M. M. et al. T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 7, p. e1006484, 10 jul. 2017.

FLANAGAN, K. L. et al. Cellular reactivity to the *P. falciparum* protein trap in adult kenyans: novel epitopes, complex cytokine patterns, and the impact of natural antigenic variation. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 3, p. 367–375, mar. 2006.

FORSSTRÖM, B. et al. Dissecting Antibodies with Regards to Linear and Conformational Epitopes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121673, 27 mar. 2015.

FRANK, R. The SPOT-synthesis technique Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. **Journal of Immunological Methods**, 2002.

FRANKLIN, B. S. et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon- $\gamma$  induced enhancement of toll-like receptor expression and function. 2009.

FREEMAN, R. R.; PARISH, C. Polyclonal B-cell activation during rodent malarial infections. 1978.

FREITAS DO ROSARIO, A. P.; LANGHORNE, J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 6, p. 549–555, maio 2012.

FRUMENCE, E. et al. Rapid  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange kinetics of AE1 in HEK293 cells and hereditary stomatocytosis red blood cells. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 305, n. 6, p. C654-662, 15 set. 2013.

GALILI, U. et al. The natural anti-alpha-galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells. **British Journal of Haematology**, v. 62, n. 2, p. 317–324, fev. 1986.

GALINSKI, M. R.; MEYER, E. V. S.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*. Em: **Advances in Parasitology**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 81p. 1–26.

GENTON, B. et al. *Plasmodium vivax* and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. e127, 17 jun. 2008.

GIBSON, J. S.; COSSINS, A. R.; ELLORY, J. C. Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. Pt 9, p. 1395–1407, maio 2000.

GIRIBALDI, G. et al. Growth of *Plasmodium falciparum* induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes. **British Journal of Haematology**, v. 113, n. 2, p. 492–499, maio 2001.

GLUSHAKOVA, S. et al. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. **Current biology: CB**, v. 15, n. 18, p. 1645–1650, 20 set. 2005.

GOEL, V. K. et al. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5164–5169, 29 abr. 2003.

GONÇALVES, R. M. et al. Cytokine Balance in Human Malaria: Does *Plasmodium vivax* Elicit More Inflammatory Responses than *Plasmodium falciparum*? **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44394, 4 set. 2012.

GONÇALVES, R. M.; LIMA, N. F.; FERREIRA, M. U. Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 4, p. 173–178, jun. 2014.

GREENWOOD, B. M. POSSIBLE ROLE OF A B-CELL MITOGEN IN HYPERGAMMAGLOBULINAEMIA IN MALARIA AND TRYPANOSOMIASIS. **The Lancet**, v. 303, n. 7855, p. 435–436, mar. 1974.

GUN, S. Y. et al. Interferons and Interferon Regulatory Factors in Malaria. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–21, 2014.

HANSEN, D. S. et al. CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 9, p. 2588–2598, set. 2003.

HIRAKO, I. C. et al. DNA-Containing Immunocomplexes Promote Inflammasome Assembly and Release of Pyrogenic Cytokines by CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD64<sup>high</sup> CD32<sup>low</sup> Inflammatory Monocytes from Malaria Patients. **mBio**, v. 6, n. 6, p. e01605-15, 31 dez. 2015.

HO, M. K.; GUIDOTTI, G. A membrane protein from human erythrocytes involved in anion exchange. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 2, p. 675–683, 25 jan. 1975.

HOGH, B. et al. Immune responses to band 3 neoantigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in subjects living in an area of intense malaria transmission are associated with low parasite density and high hematocrit value. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4362–4366, out. 1994.

- HOJO-SOUZA, N. S. et al. Phenotypic profiling of CD8<sup>+</sup> T cells during *Plasmodium vivax* blood-stage infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 35, dez. 2015.
- HOJO-SOUZA, N. S. et al. On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 42, dez. 2017.
- HOLMGREN, A. M.; MCCONKEY, C. A.; SHIN, S. Outrunning the Red Queen: bystander activation as a means of outpacing innate immune subversion by intracellular pathogens. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 1, p. 14–21, jan. 2017.
- HORTA, M. F. et al. Cell invasion by intracellular parasites – the many roads to infection. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 4, p. jcs232488, 15 fev. 2020.
- HOTZ, M. J. et al. Red Blood Cells Homeostatically Bind Mitochondrial DNA through TLR9 to Maintain Quiescence and to Prevent Lung Injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 197, n. 4, p. 470–480, 15 fev. 2018.
- HUDSON, K. E. et al. Antibodies to Senescent Antigen and C3 Are Not Required for Normal Red Blood Cell Lifespan in a Murine Model. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1425, 2017.
- ILLAMPERUMA, C.; ALLEN, B. L. Pulmonary edema due to *Plasmodium vivax* malaria in an American missionary. **Infection**, v. 35, n. 5, p. 374–376, out. 2007.
- IVANOV, I. T.; PAARVANOVA, B. K. Differential dielectroscopic data on the relation of erythrocyte membrane skeleton to erythrocyte deformability and flicker. **European biophysics journal: EBJ**, v. 50, n. 1, p. 69–86, jan. 2021.
- JAKEMAN, G. N. et al. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. **Parasitology**, v. 119 ( Pt 2), p. 127–133, ago. 1999.
- JANGPATARAPONGSA, K. et al. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 3, p. 680–686, mar. 2006.
- JANGPATARAPONGSA, K. et al. Immunity to Malaria in *Plasmodium vivax* Infection: A Study in Central China. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45971, 25 set. 2012.
- JANVIER, D. et al. A major target for warm immunoglobulin G autoantibodies: the third external loop of Band 3. **Transfusion**, v. 53, n. 9, p. 1948–1955, set. 2013.
- JENNINGS, M. L. Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 321, n. 6, p. C1028–C1059, 1 dez. 2021.
- JENNINGS, M. L.; PASSOW, H. Anion transport across the erythrocyte membrane, in situ proteolysis of band 3 protein, and cross-linking of proteolytic fragments by 4,4'-diisothiocyano dihydrostilbene-2,2'-disulfonate. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 554, n. 2, p. 498–519, 5 jul. 1979.

JUNQUEIRA, C. et al. Cytotoxic CD8+ T cells recognize and kill *Plasmodium vivax*-infected reticulocytes. **Nature Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1330–1336, set. 2018.

KAPLAN, M. H.; MEYESERIAN, M. An immunological cross-reaction between group-A streptococcal cells and human heart tissue. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7232, p. 706–710, 7 abr. 1962.

KARANTH, S. S.; MARUPUDI, K. C.; GUPTA, A. Intracerebral bleed, right haemiparesis and seizures: an atypical presentation of vivax malaria. **BMJ case reports**, v. 2014, p. bcr2014204833, 11 jun. 2014.

KARUNAWEERA, N. D. et al. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 4, p. 188–193, abr. 2003.

KATZ, C. et al. Studying protein-protein interactions using peptide arrays. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2131–2145, maio 2011.

KAWAMOTO, S. et al. Ectopic expression of band 3 anion transport protein in colorectal cancer revealed in an autoimmune hemolytic anemia patient. **Human Pathology**, v. 83, p. 193–198, jan. 2019.

KAY, M. Immunoregulation of cellular life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1057, p. 85–111, dez. 2005.

KAY, M. M. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 9, p. 3521–3525, set. 1975.

KAY, M. M. et al. Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 6, p. 1631–1635, mar. 1983.

KAY, M. M. B.; MARCHALONIS, J. J. Molecular Mapping of the Active Site of an Aging Antigen. Em: MAGNANI, M.; DE FLORA, A. (Eds.). **Red Blood Cell Aging**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston, MA: Springer US, 1991. p. 303–316.

KAY, M. M.; GOODMAN, J. R. IgG antibodies do not bind to band 3 in intact erythrocytes; enzymatic treatment of cells is required for IgG binding. **Biomedica Biochimica Acta**, v. 43, n. 6, p. 841–846, 1984.

KHO, S. et al. Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study. **PLOS Medicine**, v. 18, n. 5, p. e1003632, 26 maio 2021a.

KHO, S. et al. Hidden Biomass of Intact Malaria Parasites in the Human Spleen. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 21, p. 2067–2069, 27 maio 2021b.

KITAO, A. et al. Band 3 ectopic expression in colorectal cancer induces an increase in erythrocyte membrane-bound IgG and may cause immune-related anemia. **International Journal of Hematology**, v. 111, n. 5, p. 657–666, maio 2020.

KITCHEN, S. F. The Infection of Reticulocytes by *Plasmodium vivax*. **The American Journal of Medicine**, v. 1-18, n. 4, 1938.

KNAUF, P. A. et al. Relocation of the disulfonic stilbene sites of AE1 (band 3) on the basis of fluorescence energy transfer measurements. **Biochemistry**, v. 43, n. 38, p. 11917–11931, 28 set. 2004.

KNAUF, P. A.; ROTHSTEIN, A. Chemical modification of membranes. I. Effects of sulfhydryl and amino reactive reagents on anion and cation permeability of the human red blood cell. **The Journal of General Physiology**, v. 58, n. 2, p. 190–210, ago. 1971.

KOLLERT-JÖNS, A. et al. Anion exchanger 1 in human kidney and oncocyoma differs from erythroid AE1 in its NH<sub>2</sub> terminus. **The American Journal of Physiology**, v. 265, n. 6 Pt 2, p. F813-821, dez. 1993.

KOTEPUI, M. et al. Prevalence and risk factors related to poor outcome of patients with severe *Plasmodium vivax* infection: a systematic review, meta-analysis, and analysis of case reports. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 363, dez. 2020.

KROTOSKI, W. A. The hypnozoite and malarial relapse. **Progress in Clinical Parasitology**, v. 1, p. 1–19, 1989.

KUTE, V. B. et al. Unusual presentation of *Plasmodium vivax*: a neglected human malaria parasite. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2573–2576, jun. 2012a.

KUTE, V. B. et al. Renal cortical necrosis and acute kidney injury associated with *Plasmodium vivax*: a neglected human malaria parasite. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 2213–2216, nov. 2012b.

LACERDA, M. V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 12, dez. 2012.

LAMIKANRA, A. A. et al. Malarial anemia: of mice and men. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 18–28, 1 jul. 2007.

LANÇA, E. F. C. et al. Risk Factors and Characterization of *Plasmodium vivax*-Associated Admissions to Pediatric Intensive Care Units in the Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35406, 16 abr. 2012.

LEE, H.-J. et al. A case of vivax malaria complicated by adult respiratory distress syndrome and successful management with extracorporeal membrane oxygenation. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 51, n. 5, p. 551–555, out. 2013.

LEHMANN, P. V. et al. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. **Nature**, v. 358, n. 6382, p. 155–157, jul. 1992.

LEPKE, S. et al. A study of the relationship between inhibition of anion exchange and binding to the red blood cell membrane of 4,4'-diisothiocyano stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and its dihydro derivative (H2DIDS). **The Journal of Membrane Biology**, v. 29, n. 1–2, p. 147–177, 20 out. 1976.

- LEWIS, I. A. et al. Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 44, p. 18515–18520, 3 nov. 2009.
- LI, X. et al. A Co-ligand Complex Anchors *Plasmodium falciparum* Merozoites to the Erythrocyte Invasion Receptor Band 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 5765–5771, fev. 2004.
- LIMA, B. A. S. et al. Antibody response to a new member of the DBL family (EBP2) after a brief *Plasmodium vivax* exposure. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, p. e0010493, 17 jun. 2022.
- LIMA-JUNIOR, J. C. et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. **Vaccine**, v. 26, n. 51, p. 6645–6654, dez. 2008.
- LIMA-JUNIOR, J. C. et al. Promiscuous T-cell epitopes of *Plasmodium* merozoite surface protein 9 (PvMSP9) induces IFN- $\gamma$  and IL-4 responses in individuals naturally exposed to malaria in the Brazilian Amazon. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3185–3191, abr. 2010.
- LINDENTHAL, S.; SCHUBERT, D. Monomeric erythrocyte band 3 protein transports anions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 15, p. 6540–6544, 1 ago. 1991.
- LOMAR, A. V. et al. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 425–430, out. 2005.
- LOOAREESUWAN, S. et al. Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. **British Journal of Haematology**, v. 67, n. 4, p. 473–478, 1987.
- LÓPEZ, A. R. et al. A fatal respiratory complication of malaria caused by *Plasmodium vivax*. **Malaria Journal**, v. 22, n. 1, p. 303, 9 out. 2023.
- LOW, P. S. et al. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4686, p. 531–533, 1 fev. 1985.
- LOW, P. S. Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 864, n. 2, p. 145–167, 1986.
- LOW, P. S. et al. Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 10, p. 4592–4596, 5 abr. 1987.
- LU, J. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored micronemal antigen (GAMA) interacts with the band 3 receptor to promote erythrocyte invasion by malaria parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 4, p. 101765, abr. 2022.

- LUDIN, P.; NILSSON, D.; MÄSER, P. Genome-wide identification of molecular mimicry candidates in parasites. **PloS One**, v. 6, n. 3, p. e17546, 8 mar. 2011.
- LUDWIG, R. J. et al. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 603, 2017.
- LUX, S. E. et al. Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 23, p. 9089–9093, dez. 1989.
- MACDONALD, S. M. et al. Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10829–10832, 11 set. 2001.
- MALLELA, A. R. et al. Spontaneous Subdural Haemorrhage: A Rare Association with *Plasmodium vivax* Malaria. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 10, n. 1, p. OD05- 06, jan. 2016.
- MANTEL, P.-Y. et al. Malaria-Infected Erythrocyte-Derived Microvesicles Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 5, p. 521–534, maio 2013.
- MCCALL, M. B. B.; SAUERWEIN, R. W. Interferon- $\gamma$ —central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 6, p. 1131–1143, 7 jul. 2010.
- MEHNDIRATTA, S.; RAJESHWARI, K.; DUBEY, A. P. Multiple-organ dysfunction in a case of *Plasmodium vivax* malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 50, n. 1, p. 71–73, mar. 2013.
- MÉNARD, D. et al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 13, p. 5967–5971, 30 mar. 2010.
- MÉNARD, R. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 701–712, out. 2013.
- MENDES, K. D. S.; SILVEIRA, R. C. D. C. P.; GALVÃO, C. M. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 758–764, dez. 2008.
- MESSANA, I. et al. Human erythrocyte metabolism is modulated by the O<sub>2</sub>-linked transition of hemoglobin. **FEBS letters**, v. 390, n. 1, p. 25–28, 15 jul. 1996.
- MILLAR, S. B.; COX-SINGH, J. Human infections with *Plasmodium knowlesi*—zoonotic malaria. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 7, p. 640–648, jul. 2015.
- MILLER, L. H. et al. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **The New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 6, p. 302–304, 5 ago. 1976.

MILLHOLLAND, M. G. et al. The malaria parasite progressively dismantles the host erythrocyte cytoskeleton for efficient egress. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 10, n. 12, p. M111.010678, dez. 2011.

MILNER, D. A. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. a025569, jan. 2018.

MIN, H. M. K. et al. Immunogenicity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog in the induction of naturally acquired antibody and memory B cell responses. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 354, dez. 2017.

MINOPRIO, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 588–591, maio 2001.

MOKRA, D.; KOSUTOVA, P. Biomarkers in acute lung injury. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 209, p. 52–58, abr. 2015.

MONTES, C. L. et al. Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 5, p. 1027–1032, 1 nov. 2007.

MOURÃO, L. C. et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-119 and PvMSP-3 $\alpha$ 359–798) and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 9, p. 730–739, ago. 2012.

MOURÃO, L. C. et al. Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax* malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 397, dez. 2016.

MOURÃO, L. C. et al. Anti-band 3 and anti-spectrin antibodies are increased in *Plasmodium vivax* infection and are associated with anemia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8762, 8 jun. 2018.

MOURÃO, L. C. et al. Effects of IgG and IgM autoantibodies on non-infected erythrocytes is related to ABO blood group in *Plasmodium vivax* malaria and is associated with anemia. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 8, p. 379–383, set. 2020.

MOURÃO, L. C.; CARDOSO-OLIVEIRA, G. P.; BRAGA, É. M. Autoantibodies and Malaria: Where We Stand? Insights Into Pathogenesis and Protection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 262, 11 jun. 2020.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, set. 2009.

MÜNZ, C. et al. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 246–258, abr. 2009.

NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 489–517, 26 abr. 2018.

NAING, C. et al. Is *Plasmodium vivax* Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3071, 14 ago. 2014.

NAYAK, K. C. et al. Clinical and histopathological profile of acute renal failure caused by falciparum and vivax monoinfection: an observational study from Bikaner, northwest zone of Rajasthan, India. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 51, n. 1, p. 40–46, mar. 2014.

NOTTURNO, F. et al. Antibodies to Ganglioside Complexes in Guillain-Barré Syndrome: Clinical Correlates, Fine Specificity and Complement Activation. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 437–445, abr. 2009.

OH, S. S. et al. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 108, n. 2, p. 237–247, maio 2000.

OKUBO, K. et al. Red blood cell band 3. Lysine 539 and lysine 851 react with the same H2DIDS (4,4'-diisothiocyanodihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid) molecule. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 3, p. 1918–1926, 21 jan. 1994.

OZARSLAN, N.; ROBINSON, J. F.; GAW, S. L. Circulating Monocytes, Tissue Macrophages, and Malaria. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2019, p. 1–9, 2 out. 2019.

PACHECO, Y. et al. Bystander activation and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 103, p. 102301, set. 2019.

PANTALEO, A. et al. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. **Autoimmunity Reviews**, Naturally Occurring Antibodies in Health and Disease. v. 7, n. 6, p. 457–462, 1 jun. 2008.

PANTALEO, A. et al. Oxidized and poorly glycosylated band 3 is selectively phosphorylated by Syk kinase to form large membrane clusters in normal and G6PD-deficient red blood cells. **The Biochemical Journal**, v. 418, n. 2, p. 359–367, 1 mar. 2009.

PANTALEO, A. et al. Band 3 Erythrocyte Membrane Protein Acts as Redox Stress Sensor Leading to Its Phosphorylation by p (72) Syk. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 6051093, 2016.

PERKINS, D. J. et al. Severe Malarial Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1427–1442, 2011.

PHANUPHAK, P.; TIRAWATNPONG, S.; PANMUONG, W. Autoantibodies in falciparum malaria: a sequential study in 183 Thai patients. 1983.

POESPOPRODJO, J. R. et al. Vivax Malaria: A Major Cause of Morbidity in Early Infancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1704–1712, 15 jun. 2009.

- PORTUGAL, S. et al. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. **eLife**, v. 4, p. e07218, 8 maio 2015.
- POWELL, A. M.; BLACK, M. M. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26, n. 5, p. 427–433, jul. 2001.
- PRASAD, C. S. B. R.; APARNA, N.; HARENDRA KUMAR, M. L. Exflagellated microgametes of *Plasmodium vivax* in human peripheral blood: an uncommon feature of malaria. **Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion**, v. 27, n. 2, p. 104–106, jun. 2011.
- PUCHULU-CAMPANELLA, E. et al. Global transformation of erythrocyte properties via engagement of an SH2-like sequence in band 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 48, p. 13732–13737, 29 nov. 2016.
- PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. Pulmonary oedema in vivax malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 4, p. 421–422, 1998.
- PUNSAWAD, C. et al. Activation of nuclear factor kappa B in peripheral blood mononuclear cells from malaria patients. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 191, dez. 2012.
- QUINTERO, J. P. et al. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. suppl 1, p. 91–104, ago. 2011.
- RADTKE, A. J. et al. Lymph-Node Resident CD8 $\alpha$ + Dendritic Cells Capture Antigens from Migratory Malaria Sporozoites and Induce CD8+ T Cell Responses. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004637, 6 fev. 2015.
- RAHIMI, B. A. et al. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 481, dez. 2014.
- RANDALL, L. M.; ENGWERDA, C. R. TNF family members and malaria: Old observations, new insights and future directions. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 326–331, nov. 2010.
- REITHMEIER, R. A. F. et al. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1858, n. 7 Pt A, p. 1507–1532, jul. 2016.
- RISCO-CASTILLO, V. et al. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 5, p. 593–603, nov. 2015.
- RIVERA-CORREA, J. et al. *Plasmodium* DNA-mediated TLR9 activation of T-bet+ B cells contributes to autoimmune anaemia during malaria. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1282, 3 nov. 2017.

- RIVERA-CORREA, J. et al. Autoantibody levels are associated with acute kidney injury, anemia and post-discharge morbidity and mortality in Ugandan children with severe malaria. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 14940, 17 out. 2019a.
- RIVERA-CORREA, J. et al. Atypical memory B-cells are associated with *Plasmodium falciparum* anemia through anti-phosphatidylserine antibodies. **eLife**, v. 8, p. e48309, 12 nov. 2019b.
- RIVERA-CORREA, J. et al. Atypical memory B-cells and autoantibodies correlate with anemia during *Plasmodium vivax* complicated infections. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008466, 20 jul. 2020.
- RIVERA-CORREA, J.; RODRIGUEZ, A. Divergent Roles of Antiself Antibodies during Infection. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 7, p. 515–522, jul. 2018.
- RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; BENITEZ, J. A.; ARRIA, M. Malaria Mortality in Venezuela: Focus on Deaths due to *Plasmodium vivax* in Children. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 54, n. 2, p. 94–101, 25 nov. 2007.
- ROGERSON, S. J.; CARTER, R. Severe Vivax Malaria: Newly Recognised or Rediscovered? **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. e136, 17 jun. 2008.
- ROJAS, M. et al. Molecular mimicry and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 95, p. 100–123, dez. 2018.
- ROSENBERG, E. B. et al. IgM antibodies to red cells and autoimmune anemia in patients with malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, n. 2, p. 146–152, 1 mar. 1973.
- ROSENBERG, Y. J. Autoimmune and polyclonal B cell responses during murine malaria. **Nature**, v. 274, n. 5667, p. 170–172, jul. 1978.
- SALEH, B. H. et al. Autoantibodies against red blood cell antigens are common in a malaria endemic area. **Microbes and Infection**, v. 25, n. 3, p. 105060, mar. 2023.
- SALHANY, J. M.; CORDES, K. A.; SLOAN, R. L. Mechanism of band 3 dimer dissociation during incubation of erythrocyte membranes at 37 degrees C. **The Biochemical Journal**, v. 345 Pt 1, n. Pt 1, p. 33–41, 1 jan. 2000.
- SCHLÜTER, K.; DRENCKHAHN, D. Co-clustering of denatured hemoglobin with band 3: its role in binding of autoantibodies against band 3 to abnormal and aged erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 16, p. 6137–6141, ago. 1986.
- SCOPEL, K. K. G. et al. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás—Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 61–64, 1 mar. 2004.
- SHIP, S. et al. Synthesis of tritiated 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulfonic acid ([<sup>3</sup>H]DIDS) and its covalent reaction with sites related to anion transport in human red blood cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 33, n. 3–4, p. 311–323, 12 maio 1977.

SINGH, H. et al. *Plasmodium vivax* malaria: Is it actually benign? **Journal of Infection and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 91–95, jun. 2011.

SINKA, M. E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 69, dez. 2012.

SIQUEIRA, A. M. et al. Severe Rhabdomyolysis Caused by *Plasmodium vivax* Malaria in the Brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 271–273, 5 ago. 2010.

SIVEP-MALARIA/SVS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Malária – Brasil – Profile | Tableau Public**. Disponível em: <<https://public.tableau.com/app/profile/mal.ria.brasil>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

SOARES, R. R. et al. Apical membrane protein 1-specific antibody profile and temporal changes in peripheral blood B-cell populations in *Plasmodium vivax* malaria. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 9, p. e12662, set. 2019.

SOUZA, M. T. D.; SILVA, M. D. D.; CARVALHO, R. D. Integrative review: what is it? How to do it? **Einstein (São Paulo)**, v. 8, n. 1, p. 102–106, mar. 2010.

STANISIC, D. I. et al.  $\gamma\delta$  T cells and CD14+ Monocytes Are Predominant Cellular Sources of Cytokines and Chemokines Associated With Severe Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 2, p. 295–305, 15 jul. 2014.

STURM, A. et al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, set. 2006.

SULIMAN, B. A. Potential clinical implications of molecular mimicry-induced autoimmunity. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 12, n. 2, p. e1179, 1 fev. 2024.

SUNDARESAN, B. et al. The Role of Viral Infections in the Onset of Autoimmune Diseases. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 782, 18 mar. 2023.

SUTHERLAND, C. J. et al. Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 10, p. 1544–1550, 15 maio 2010.

TA, T. H. et al. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 68, dez. 2014.

TANNER, M. J. A. Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, n. 2, p. 133–139, mar. 2002.

TANNER, M. J. A.; MARTIN, P. G.; HIGH, S. The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. **Biochemical Journal**, v. 256, n. 3, p. 703–712, 15 dez. 1988.

TAVARES, J. et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p. 905–915, 6 maio 2013.

- TEO, A. et al. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 887–898, nov. 2016.
- THIAGARAJAN, P.; PARKER, C. J.; PRCHAL, J. T. How Do Red Blood Cells Die? **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 655393, 2021.
- TIBA, F. et al. Constitutive activation and accelerated maturation of peripheral blood t cells in healthy adults in burkina faso compared to Germany: The case of malaria? **European Journal of Medical Research**, v. 16, n. 12, p. 519, 2011.
- TJITRA, E. et al. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. e128, 17 jun. 2008.
- TOTINO, P. R. R. et al. Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. **Malaria Journal**, v. 9, p. 350, 2 dez. 2010.
- TOUGH, D. F.; BORROW, P.; SPRENT, J. Induction of Bystander T Cell Proliferation by Viruses and Type I Interferon in Vivo. **Science**, v. 272, n. 5270, p. 1947–1950, 28 jun. 1996.
- TOVAR ACERO, C. et al. IL-4, IL-10, CCL2 and TGF- $\beta$  as potential biomarkers for severity in *Plasmodium vivax* malaria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 9, p. e0010798, 30 set. 2022.
- VAL, F. et al. Respiratory Complications of *Plasmodium vivax* Malaria: Systematic Review and Meta-Analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 733–743, 7 set. 2017.
- VAN DOOREN, G. G. et al. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 405–419, jul. 2005.
- VANDERLUGT, C. J.; MILLER, S. D. Epitope spreading. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 6, p. 831–836, dez. 1996.
- VANDERLUGT, C. L.; MILLER, S. D. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 2, p. 85–95, 1 fev. 2002.
- VENTURA, A. M. R. D. S. et al. Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium vivax* malaria in the Pará state, Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 181, p. 122–131, maio 2018.
- VINCE, J. W.; REITHMEIER, R. A. Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 43, p. 28430–28437, 23 out. 1998.
- VINCE, J. W.; REITHMEIER, R. A. Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger AE1. **Biochemistry**, v. 39, n. 18, p. 5527–5533, 9 maio 2000.

WATANABE, T. Improving outcomes for patients with distal renal tubular acidosis: recent advances and challenges ahead. **Pediatric Health, Medicine and Therapeutics**, v. 9, p. 181–190, 2018.

WAUGH, S. M. et al. Heinz bodies induce clustering of band 3, glycophorin, and ankyrin in sickle cell erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 5, p. 1155–1160, nov. 1986.

WAUGH, S. M.; LOW, P. S. Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. **Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 34–39, 1 jan. 1985.

WEISS, G. E. et al. Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004670, 27 fev. 2015.

WHITE, N. J. et al. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, fev. 2014.

WHITE, N. J. Anaemia and malaria. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 371, dez. 2018.

WHO. World malaria report 2023. 2023.

WICKRAMASINGHE, S. N. et al. Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. **British Journal of Haematology**, v. 72, n. 1, p. 91–99, maio 1989.

WILLIAMSON, R. C.; TOYE, A. M. Glycophorin A: Band 3 aid. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 41, n. 1, p. 35–43, 2008.

WINOGRAD, E.; PRUDHOMME, J. G.; SHERMAN, I. W. Band 3 clustering promotes the exposure of neoantigens in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 142, n. 1, p. 98–105, jul. 2005.

WINOGRAD, E.; SHERMAN, I. W. Malaria infection induces a conformational change in erythrocyte band 3 protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 83–87, nov. 2004.

WOODRUFF, A. W.; ANSDELL, V. E.; PETTITT, L. E. CAUSE OF ANÆMIA IN MALARIA. **The Lancet**, v. 313, n. 8125, p. 1055–1057, 19 maio 1979.

WOZENCRAFT, A. O. et al. Role of DNA-binding antibodies in kidney pathology associated with murine malaria infections. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 7, p. 2156–2164, jul. 1990.

ZAKI, L. et al. Chemical modification of membrane proteins in relation to inhibition of anion exchange in human red blood cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 86, n. 3 Pt 1, p. 471–494, dez. 1975.

ZEESHAN, M. et al. Host-parasite interaction: selective Pv-fam-a family proteins of *Plasmodium vivax* bind to a restricted number of human erythrocyte receptors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 7, p. 1111–1120, 1 abr. 2015.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74–e80, 21 out. 2010.