

**LILIAN LACERDA BUENO**

***RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL DE PACIENTES INFECTADOS  
POR Plasmodium vivax FRENTE AO ANTÍGENO 1 DE MEMBRANA APICAL  
(AMA-1)***

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Belo Horizonte

2011

**LILIAN LACERDA BUENO**

***RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL DE PACIENTES INFECTADOS  
POR Plasmodium vivax FRENTE AO ANTÍGENO 1 DE MEMBRANA APICAL  
(AMA-1)***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Parasitologia

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

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Belo Horizonte

2011

Bueno, Lilian Lacerda

Resposta imune celular e humoral de pacientes infectados por *Plasmodium vivax* frente ao antígeno 1 de membrana apical (AMA-1). [manuscrito] / Lilian Lacerda Bueno. – 2011

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

Orientadora: Érika Martins Braga

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia.

1. *Plasmodium vivax* – Teses. 2. Resposta imune – Teses. 3. Células dendríticas – Teses. 4. Malaria – Teses. 5. Parasitologia – Teses. 6. Antígeno de membrana apical (AMA-1). 7. Células T reguladoras. I. Braga, Érika Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. III. Título.

CDU: 616.936

---

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Bolsa de Doutorado/2008-2011) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), processo número CBB 625/06 e Pronex Malaria, DECIT/MS (555646/2009-2).

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG em 10 de abril de 2007 (Parecer número ETIC 060/07).

---

*Ao Ricardo,  
só amor...sempre amor!*

---

## AMAR

*Que pode uma criatura senão,  
entre criaturas, amar?  
amar e esquecer,  
amar e malamar,  
amar, desamar, amar?  
sempre, e até de olhos vidrados, amar?*

*Que pode, pergunto, o ser amoroso,  
sozinho, em rotação universal, senão  
rodar também, e amar?  
amar o que o mar traz à praia,  
o que ele sepulta, e o que, na brisa marinha,  
é sal, ou precisão de amor, ou simples ânsia?*

*Amar solenemente as palmas do deserto,  
o que é entrega ou adoração expectante,  
e amar o inóspito, o áspero,  
um vaso sem flor, um chão de ferro,  
e o peito inerte, e a rua vista em sonho,  
e uma ave de rapina.*

*Este o nosso destino: amor sem conta,  
distribuído pelas coisas pérfidas ou nulas,  
doação ilimitada a uma completa ingratidão,  
e na concha vazia do amor a procura medrosa,  
paciente, de mais e mais amor.*

*Amar a nossa falta mesma de amor, e na segura nossa  
amar a água implícita, e o beijo tácito, e a sede infinita.*

**Carlos Drummond de Andrade**

Agradeço, especialmente, a minha orientadora Érika Martins Braga por todos os ensinamentos ao longo desses cinco anos de trabalho (mestrado e doutorado), mas também de muita diversão. Muito obrigada por me abrir as portas do seu laboratório, pelo carinho, apoio, amizade e respeito, e pela oportunidade de conhecer e trabalhar na área endêmica com pacientes infectados por *Plasmodium vivax*.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos pesquisadores Cor Jesus Fontes, Irene Soares, Oscar Bruna-Romero, Marcus Vinícius Lacerda, Rodrigo Corrêa-Oliveira, Juliana Estanislau Gomes, Carlos Olortegi Chaves, Daniella Bartholomeu e Ricardo Fujiwara pelas importantes contribuições na realização desse trabalho.

Ao meu marido Ricardo, muito obrigada por estar sempre presente, pelo apoio, pelas discussões a respeito da imunoparasitologia, pela paciência, pela amizade, pela confiança, pelo amor e, agora, principalmente pelo Guilherme.

Aos meus pais, Vicente e Nazaré, que são os meus exemplos, por me mostrarem, ainda que sem pretensões, onde está o meu norte.

Aos meus queridos irmãos Cynthia, Du e Lé, obrigada pelo apoio, por estarmos sempre juntos, por sermos irmãos.

À minha querida sobrinha Alice, que só veio abrilhantar ainda mais a minha vida.

Aos meus cunhados, Gustavo, Júnior e Vi, pela presença sempre amiga.

Aos meus sogros, Cida e Kimiaki, sempre tão carinhosos e gentis e por me apoiarem incondicionalmente.

À Sumara, por resolver tudo da melhor forma, pela amizade, pela paciência.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Parasitologia pelos ensinamentos.



À Cristiane Moraes, por ser uma grande companheira nessa jornada, tanto na área endêmica como no laboratório.

Às meninas do laboratório, Nayara, Pati e Luíza, pela amizade e companheirismo, e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos demais colegas de laboratório, Zélia, Adriana, Rafael e Gabriel, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Às amigas Cris e Márcia, por estarmos juntas há muitos anos e sempre dividindo as alegrias e tristezas.

A todos os colegas do Departamento de Parasitologia, principalmente àqueles que colaboraram de alguma forma para a finalização deste trabalho, muito obrigada.

E, por fim, agradeço acima de tudo a Deus, porque sem ele nada é possível.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1. Situação atual da malária.....	15
1.2. O ciclo dos plasmódios nos seus hospedeiros.....	20
1.3. Resposta imune contra Plasmodium.....	22
1.4. Células dendríticas.....	26
1.5. Células T reguladoras.....	29
1.6. Células Th17.....	33
1.7. Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) como potencial candidato vacinal.....	35
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo geral.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. Indivíduos e área de estudo.....	42
4.2. Antígeno.....	43
4.2.1. Antígeno 1 da Membrana Apical de <i>P. vivax</i> (Pv-AMA-1).....	43
4.3. ELISA para detecção de anticorpos IgG total anti-Pv-AMA-1, DII e peptídeo.....	44
4.3.1. ELISA para detecção de subclasses de IgG total anti-Pv-AMA-1e DII.....	45
4.4. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.....	46
4.5. Diferenciação de células dendríticas na presença do antígeno recombinante Pv-AMA-1.....	46
4.6. Culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	47
4.7. Perfil fenotípico de células dendríticas diferenciadas na presença ou ausência dos antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e avaliação da apresentação de peptídeos derivados de Pv-AMA-1.....	48
4.8. Determinação da produção de citocinas e quimiocinas por ELISA de captura.....	49
4.9. Determinação do perfil de células reguladoras e avaliação funcional após estímulo de PBMCs com antígeno recombinante de <i>P. vivax</i> .....	49
4.10. Determinação do perfil de células Th17 em PBMCs.....	50
4.11. Predição de epitopos de células B na proteína Pv-AMA-1.....	51
4.12. Síntese de peptídeos em fase sólida.....	51
4.13. Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS.....	54
6. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	131
7. CONCLUSÕES.....	144
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1: Distribuição geográfica e endemicidade da malária no mundo.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2: Mapa de risco da malária nos Estados da Amazônia legal no ano de 2000 e 2008.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 3: Surtos de malária ocorridos na Região Não-Amazônica, 1999 a 2007.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 4: Antígeno de Membrana Apical 1.....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMA-1 – Antígeno 1 de membrana apical

ANOVA – Análise de variância

CD – “Cluster of differentiation”/grupamento de diferenciação

DC – Célula dendrítica

DII – Domínio II da proteína AMA-1

FcγR – Receptor de IgG

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF – Fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos

HLA-DR – “Histocompatibility leukocyte antigen – Molecule DR”/ Molécula do complexo de histocompatibilidade principal de classe II

iDC – Células Dendríticas imaturas

IFN-γ – Interferon gamma

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

MACS – “Magnetic activated cell sorting”/ separação celular ativada por magnetismo

MFI – Intensidade média de fluorescência

NK – “Natural Killer”

NO – Óxido nítrico

OPD – “O-phenylenediamine”

PBMC – “Peripheral blood mononuclear cells”/ Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação da cadeia de polimerase

PE – Ficoeritrina

PE-Cy5 – Ficoeritrina conjugada com a molécula “cychrome 5”

Th – Células auxiliadoras

Th17 – Células auxiliadoras produtoras de IL-17

Treg – Células T reguladoras

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

WHO – “World Health Organization”/ Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

A malária é uma das doenças parasitárias de maior importância global e das principais causas de morbidade e mortalidade nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Apesar dos esforços para o controle da infecção em diferentes áreas endêmicas, a malária continua em expansão, e as medidas tradicionais de controle da transmissão são pouco eficazes. Portanto, como ferramenta adicional de controle, uma vacina efetiva contra essa doença parasitária se faz necessária. O entendimento dos mecanismos envolvidos na determinação da imunidade naturalmente adquirida é um importante pré-requisito para o estabelecimento de vacinas realmente eficazes. Entretanto, os mecanismos envolvidos na modulação da função da resposta celular durante a infecção ainda não estão totalmente esclarecidos.

Na tentativa de compreender os possíveis mecanismos imunes envolvidos na infecção por *P. vivax*, descrevemos, na primeira parte do trabalho, a maturação de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes infectados por *P. vivax*. Foi observado que os indivíduos infectados apresentaram uma modulação da expressão da maioria dos marcadores de superfície celular avaliados, verificada pela redução significativa da expressão de CD11c, CD1a, HLA-ABC, HLA-DR, CD80, CD86, CD40, CD64 e CD14 ( $P \leq 0,05$ ). Além disso, foi observado que as células dendríticas desses pacientes, quando diferenciadas na presença do antígeno AMA-1, desencadearam um aumento da expressão das moléculas apresentadoras de antígeno CD1a e HLA-DR. Na segunda parte do trabalho, avaliamos a participação de células T reguladoras (Treg) no processo de infecção por *P. vivax*. Demonstramos que pacientes infectados apresentaram um aumento significativo do número de células Treg circulantes produtoras de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL-17), correlacionando-se positivamente com a carga parasitária. A expressão das moléculas GITR e CTLA-4 em células Treg foi significativamente maior em indivíduos infectados, apresentando, também, uma associação positiva com a parasitemia. O efeito supressivo de células Treg na resposta proliferativa de linfócitos T de indivíduos infectados, estimuladas pelo antígeno Pv-AMA-1, um importante candidato vacinal, também foi experimentalmente evidenciado. Na terceira etapa do trabalho,

demonstramos que a frequência de células Th17 está aumentada durante a infecção por *P. vivax*, e que o número absoluto dessas células está diretamente correlacionado com o número de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ . Finalmente, avaliamos *in silico* a predição de possíveis epitopos de células B na proteína Pv-AMA-1. Nossos resultados demonstraram que o DII da proteína se apresenta como a região de maior potencial antigênico, baseado nos parâmetros entropia e sequência de aminoácidos. O peptídeo sintético gerado a partir dessas análises apresentou reatividade sorológica semelhante ao observado para o ectodomínio e para o DII da proteína.

Nossos resultados sugerem que a infecção por malária vivax apresenta diferentes mecanismos de modulação da resposta imune do hospedeiro que poderiam influenciar significativamente o curso da infecção malárica.

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A malária é causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, à família *Plasmodiidae* e ao gênero *Plasmodium*. Quatro espécies de *Plasmodium* são reconhecidas como parasitos naturais do homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Contudo, em estudos recentes foram observadas infecções maláricas em humanos causadas por *Plasmodium knowlesi*, uma espécie que circula especialmente entre macacos (*Macaca fascicularis* e *Macaca nemestrina*) no continente asiático, podendo ser detectada no homem (Cox-Singh *et al.*, 2008; van Hellemond *et al.*, 2009). Esses relatos evidenciam que essa espécie pode ser transmitida para o homem, mas mantém um caráter zoonótico diferente daquele verificado para as outras quatro espécies de plasmódios humanos.

A infecção por essas diferentes espécies de *Plasmodium* tem suas características próprias, bem como apresenta diferenças nas suas áreas de distribuição (Braga *et al.*, 2002a; Bledsoe, 2005). Dentre essas espécies, *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo, sendo o *P. falciparum* a espécie de maior impacto devido aos altos níveis de mortalidade, sua resistência a drogas antimaláricas e sua dominância sobre o continente africano.

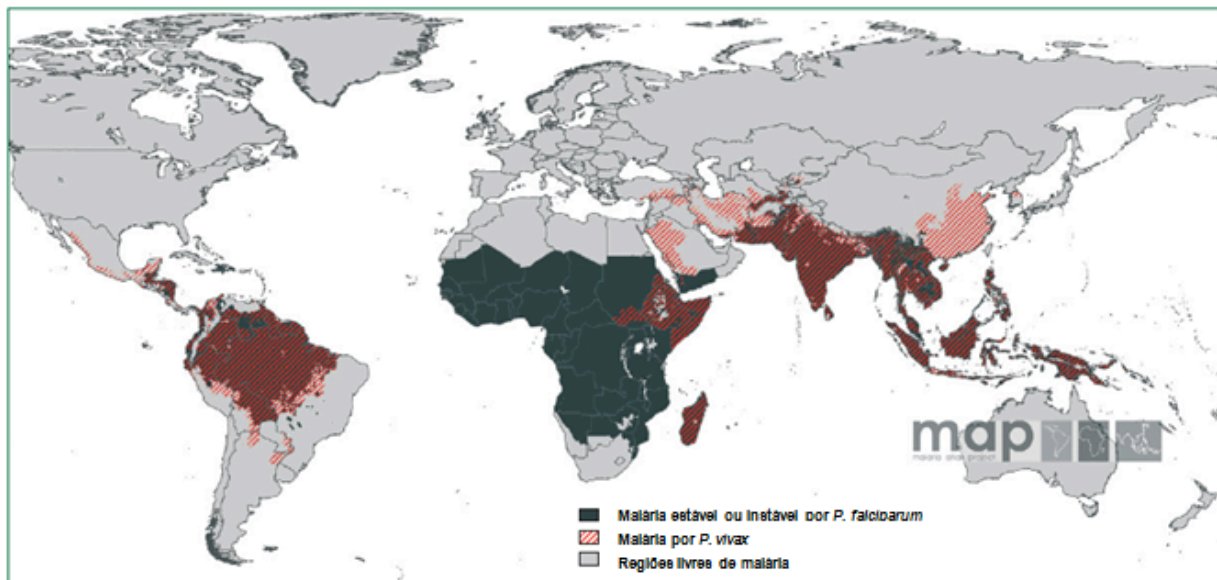
## 1.1. Situação atual da malária

A malária é a doença parasitária mais comum, causadora de mortalidade e morbidade em países localizados em regiões tropicais e subtropicais, e continua sendo o maior desafio em saúde pública em todo o mundo (Doolan *et al.*, 2003; Good *et al.*, 2005; WHO, 2008). Embora tenha sido descrita há cerca de cento e vinte anos, a doença tem resistido a todas as formas de controle empregadas até hoje (Good *et al.*, 2005; WHO, 2008). A doença é endêmica em mais de cem países, e a cada ano é estimado que cerca de 200-600 milhões de pessoas fiquem doentes devido à infecção por malária e que mais de um milhão morram, sendo a maioria crianças residentes no continente africano. Estima-se que 40% da população do mundo permaneçam sob o



risco de infecção por malária (Good *et al.*, 2005; WHO, 2008). Estimativas indicam que a população sob risco de malária falciparum e vivax seja de 2,5 e 2,6 bilhões de pessoas, respectivamente (Guerra *et al.*, 2006). Para a infecção por *P. vivax*, ao contrário dos 70-80 milhões de casos anuais previamente descritos (Mendis *et al.*, 2001), é estimado que esse número alcance de 130 a 435 milhões de casos a cada ano (Hay *et al.*, 2004). A elevada ocorrência de malária vivax importada, observada nos últimos anos, tem alertado as autoridades governamentais em muitos países desenvolvidos (WHO, 2008). Além disso, estudos recentes sugerem que o impacto clínico causado por essa infecção tem sido subestimado e que seu impacto econômico nunca foi adequadamente considerado (WHO, 2008).

Embora a grande maioria das mortes causadas por malária ocorra na África, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania (Figura 1). Enquanto *P. falciparum* prevalece no continente africano, o *P. vivax* é a espécie prevalente na Ásia e América Latina (Palmer *et al.*, 1998; Sharma, 1999; San Sebastian *et al.*, 2000).



**Figura 1: Distribuição geográfica e endemidade da malária no mundo. Fonte: Adaptado de Malaria Atlas Project**

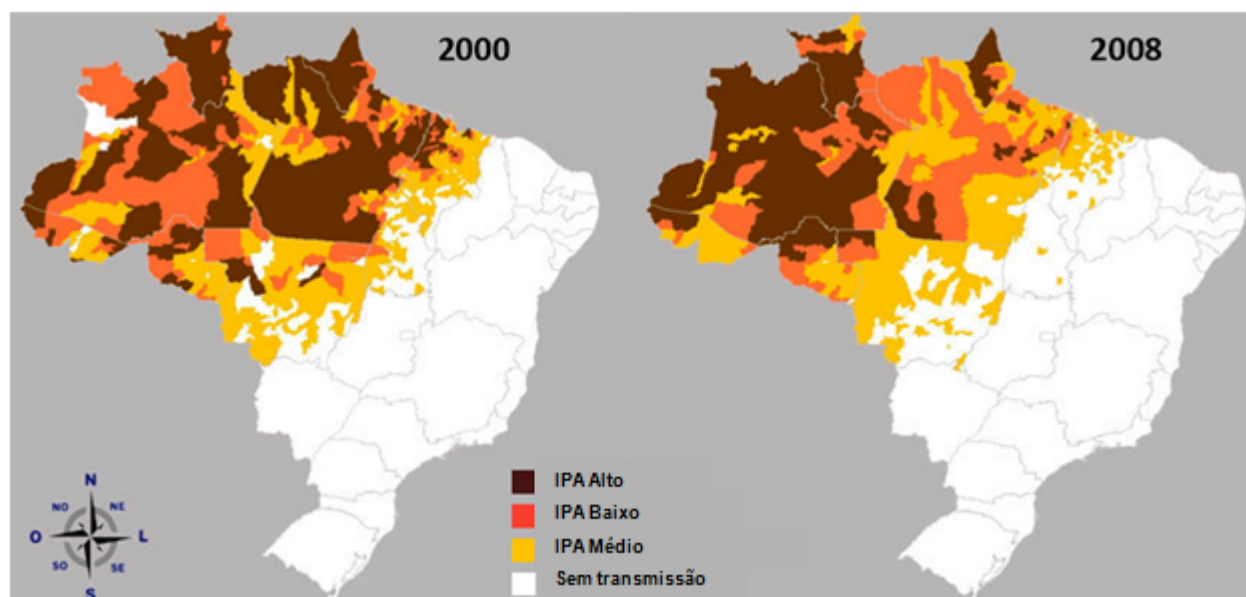
Na América Latina, a malária representa um sério problema de saúde pública, afetando a vida e a saúde de determinados grupos sociais, particularmente aqueles

voltados para as atividades econômicas relacionadas à floresta, à mineração e ao trabalho na construção de estradas e usinas hidrelétricas (Marques, 1987).

No Brasil, a malária é endêmica na região amazônica, e mais de 99% dos casos notificados ocorrem na região Norte e parte da região Centro-Oeste, nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá, Maranhão, Tocantins e Mato Grosso (Figura 2). Em 2007, foram notificados pelo menos 200 casos autóctones, sendo o *P. vivax* a espécie prevalente no Brasil com 83,7% dos casos (SIVEP, 2005; Oliveira-Ferreira et al., 2010), enquanto outros 16,3% foram devidos ao *P. falciparum*. Diferentemente de *P. falciparum*, a infecção por *P. vivax* raramente leva a quadros letais, causando a forma malárica denominada terçã benigna. Entretanto, a prostração constante causada pela infecção é causa importante de morbidade e perdas socioeconômicas (Cui et al., 2003). Além disso, estudos recentes utilizando a técnica de PCR para diagnóstico da infecção demonstraram que alguns pacientes infectados apenas com *P. vivax* apresentavam quadros de malária cerebral, síndrome aguda do estresse respiratório, além de falência renal (Beg et al., 2002; Kochar et al., 2005; Saleri et al., 2006; Kumar et al., 2007; Bassat et al., 2011). Em outro estudo, foi demonstrado que a citoaderência e o sequestro de eritrócitos, antes só descritos na infecção por *P. falciparum*, podem ter um papel importante na patofisiologia da malária vivax (Carvalho et al., 2010). Importa salientar que as manifestações clínicas também geram uma alta carga socioeconômica para as grandes cidades e a área rural da região intra-amazônica (Coura et al., 2006).

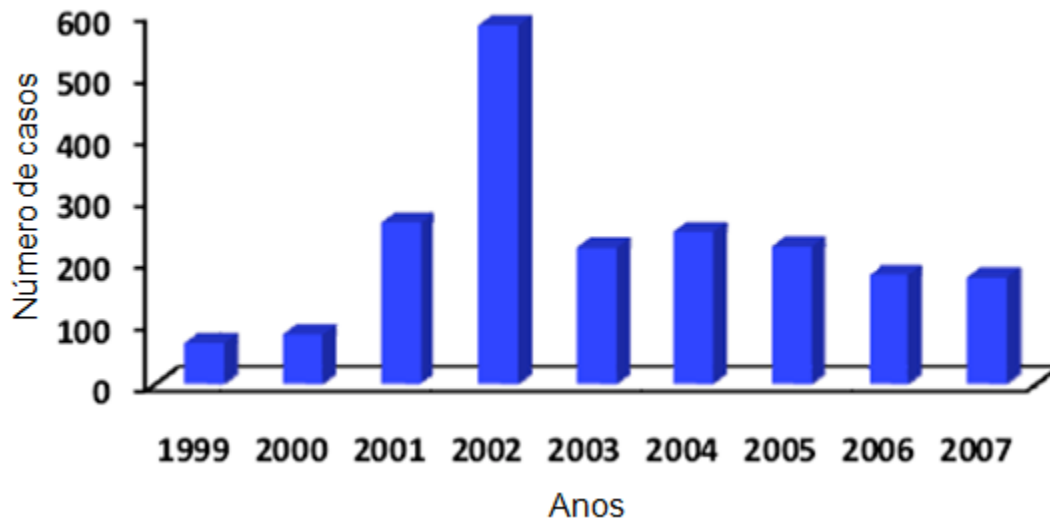
O padrão de transmissão da malária no Brasil é diferente do observado nas áreas hiper-holoendêmicas, caracterizando-se como hipo a mesoendêmica, de transmissão instável e com flutuações sazonais anuais (Camargo et al., 1996; Braga et al., 2002b; Coura et al., 2006). A malária não se apresenta distribuída uniformemente em toda região amazônica, uma vez que se observam áreas com diferentes níveis de transmissão da doença. As áreas de maior transmissão são frequentemente aquelas de colonização recente (Oliveira-Ferreira et al., 2010), principalmente garimpos, (Sawyer, 1993), populações ribeirinhas e assentamentos (Alves et al., 2002), onde as condições precárias de moradia associadas aos hábitos da população favorecem a transmissão. Por outro lado, com o avanço do desmatamento e o estabelecimento da agricultura, e o desenvolvimento urbano, a transmissão da malária parece

substancialmente reduzida, sendo o risco de novas infecções direcionados por fatores do comportamento humano (de Castro *et al.*, 2006; Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).



**Figura 2: Mapa de risco da malária nos Estados da Amazônia legal nos anos de 2000 e 2008. (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010)**

Na região extra-amazônica, onde a malária não apresenta caráter endêmico, vários surtos foram notificados, como demonstrado na Figura 3. Esse é um quadro bastante preocupante, pois essas regiões reúnem condições favoráveis ao estabelecimento e manutenção da transmissão, como população susceptível e presença do vetor, além de boas condições ecológicas, geográficas e econômicas para o estabelecimento do foco malarígeno (Ministério da Saúde, 2005).



**Figura 3: Surto de malária ocorridos na Região Não-Amazônica, 1999 a 2007**  
 Fonte: (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010)

A estratégia de controle estabelecida na Conferência Ministerial de Amsterdã, promovida pela Organização Mundial de Saúde, se baseia em um rápido diagnóstico da infecção, bem como no tratamento apropriado realizado de forma ordenada (Loiola *et al.*, 2002; Coura *et al.*, 2006; WHO, 2008).

Diante do quadro de gravidade registrado pelo alarmante número de casos no ano de 1999 (637.470), o Ministério da Saúde (MS) lançou, no ano de 2000, um importante plano de intensificação das ações de controle de malária (PIACM) para a Amazônia Legal. Neste plano, o MS comprometeu-se a reduzir em 50% o número de casos de malária até o final do ano de 2001 em comparação com o ano de 1999, e em 50% a mortalidade por malária até o final do ano 2002, também em comparação com os dados registrados para o ano de 1999 (Loiola *et al.*, 2002). Estima-se que o resultado desse programa de controle tenha evitado 1,5 milhão de casos novos da doença entre os anos de 2000 a 2002 (Ministério da Saúde, 2005). Entretanto, nos anos de 2003 e 2005 o número de infecções na região intra-amazônica cresceu novamente e quase chegou à situação registrada no ano 1999. Acredita-se que vários fatores possam ter influenciado esse novo e assustador aumento de casos na região. Dentre eles, pode-se destacar as mudanças climáticas, ocupação desordenada das grandes cidades da região, reforma agrária sem planejamento adequado levando a um desflorestamento desordenado, além de assentamentos não oficiais.

O programa de controle em operação atualmente no Brasil é o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM). Este programa tem como principal objetivo a redução da incidência e da taxa de mortalidade, além de eliminar a transmissão dentro de áreas urbanas das capitais brasileiras, e manter a ausência de transmissão em localidades onde a transmissão foi eliminada (Coura *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2007; Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010)

### **1.2. O ciclo dos plasmódios nos seus hospedeiros**

O ciclo do parasito no hospedeiro invertebrado se inicia quando macrogametócitos e microgametócitos são ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles sp.* durante o repasto sanguíneo no homem. Inicia-se então uma fase sexuada no interior de seu estômago, resultando na fecundação e formação de um ovo ou zigoto (oocineto). Posteriormente, o zigoto migra através da camada única de células do estômago do mosquito, posicionando-se entre esta e sua membrana basal. Assim, por esporogonia, resultam centenas de formas infectantes (esporozoítos) que migram para as glândulas salivares do mosquito vetor, as quais poderão, no momento da picada, serem inoculadas no homem (Bledsoe, 2005).

A infecção no homem tem início nesse momento, quando os esporozoítos são inoculados juntamente com a saliva na circulação sanguínea e/ou no tecido subcutâneo do hospedeiro (Mota *et al.*, 2001; Amino *et al.*, 2006). Apenas uma proporção dos parasitos entra nos capilares sanguíneos enquanto outros são drenados para os vasos linfáticos, atingindo os linfonodos (Amino *et al.*, 2006). Os esporozoítos que atingem os linfonodos podem se desenvolver como formas exo-eritrocíticas, porém, são degradados por leucócitos. Apenas aqueles que atingem a circulação sangüínea são capazes de se desenvolverem após infectarem os hepatócitos (Amino *et al.*, 2006). Antes de invadir as células hospedeiras, os esporozoítos migram por várias células do hospedeiro (Mota *et al.*, 2001; Frevert, 2004), danificando a membrana plasmática nesse processo (transmigração do esporozoíto). Algumas células são capazes de reparar o dano enquanto outras morrerão por necrose em poucos minutos (Mota *et al.*, 2001). Essa passagem pelas células hospedeiras antes de atingirem os hepatócitos

parece ser fundamental para o ciclo de vida dos plasmódios, induzindo a secreção de uma substância chamada fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), a qual torna tais células mais susceptíveis à infecção (Mota *et al.*, 2001; Carrolo *et al.*, 2003). O reconhecimento e a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos parecem envolver a participação de pelo menos duas proteínas: a proteína circum-esporozoíto (CS) (Kappe *et al.*, 2003) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP) (Trottein *et al.*, 1995).

Após invasão dos hepatócitos, os esporozoítos se multiplicam por reprodução assexuada dando origem a milhares de merozoítos (ciclo exo-eritrocítico). O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente uma semana, para o *P. falciparum* e *P. vivax*, e cerca de duas semanas para o *P. malariae* (Krotoski, 1985). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, durante a fase exo-eritrocítica, podem surgir formas latentes denominadas hipnozoítos que permanecem nas células do fígado por tempo variável, causando recaídas da doença (Krotoski, 1985).

Os merozoitos formados durante a fase exo-eritrocítica são liberados do fígado para a circulação sanguínea por meio de estruturas vesiculares denominadas merossomos (Sturm *et al.*, 2006). Esses merossomos se deslocam para os sinusóides hepáticos garantindo a liberação de merozoítos vivos diretamente na circulação sanguínea. Os merozoítos intra-hepáticos consomem o cálcio intracelular e previnem, desta forma, a exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática de hepatócitos parasitados, protegendo-os assim da fagocitose por células de Küpffer e outras células fagocíticas presentes nos sinusóides hepáticos (Sturm *et al.*, 2006). Estima-se que cada hepatócito parasitado libera até 40.000 merozoítos (Nardin *et al.*, 1993; Good *et al.*, 2005), que infectarão eritrócitos e começarão um novo ciclo de reprodução assexuada, levando a uma lise das células vermelhas a cada 48 a 72 horas (ciclo eritrocítico) de acordo com a espécie de plasmódio envolvida. Esse sincronismo é o que causa o cenário de febres cíclicas em infecções estabelecidas. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, uma pequena proporção destes parasitos se diferencia em estágios sexuais, os gametócitos, que originarão esporozoítos no inseto vetor, após novo repasto sanguíneo. Ainda não se sabe ao certo qual o estímulo ou mensagem responsável pela produção de gametócitos, mas

existem duas hipóteses: a primeira sugere que os merozoítos já estão predeterminados a evoluírem em formas assexuadas ou sexuadas antes de invadirem a hemácia; outra hipótese, ao contrário, sugere que fatores ambientais ou estresse determinem a diferenciação dos merozoítos em gametócitos (Dyer *et al.*, 2000).

### **1.3. Resposta imune contra Plasmodium**

A resposta imune contra *Plasmodium* pode ser desenvolvida especificamente contra cada um dos estágios do parasito (Good *et al.*, 2005). Tem sido demonstrado em modelos experimentais que a sobrevivência à malária é ligada à habilidade de controlar a reprodução dos estágios sanguíneos do parasito nas primeiras semanas após a infecção (Stevenson *et al.*, 2004). De fato, as formas sanguíneas dos plasmódios são as responsáveis pelas manifestações patológicas da doença, uma vez que os sintomas clínicos são decorrentes do desenvolvimento parasitário durante o ciclo assexuado sanguíneo. A imunidade frente a esses estágios sanguíneos poderia contribuir para a redução ou a eliminação dos parasitos e, conseqüentemente, as manifestações clínicas da doença.

Diversas evidências sugerem que uma imunidade protetora naturalmente adquirida contra a malária seja obtida após infecções sucessivas (Cohen *et al.*, 1961; McGregor, 1974; Baird *et al.*, 1991). Crianças intensamente expostas à transmissão apresentam sucessivos episódios clínicos de malária. Com o passar da idade, os sintomas clínicos da doença são menos pronunciados, embora os indivíduos possam apresentar altas parasitemias sanguíneas (Egan *et al.*, 1996). Em adultos, observa-se parasitemia baixa, refletindo um equilíbrio da relação parasito-hospedeiro e também um estado de premunição que pode ser bem observado em áreas onde a malária é holo-hiperendêmica (Druilhe *et al.*, 1987). De uma maneira geral, a imunidade naturalmente adquirida é parcialmente cepa-específica e leva primeiramente a uma redução da taxa de mortalidade e da incidência de complicações e, mais tarde, a um decréscimo da incidência da doença. Por último, essa imunidade naturalmente adquirida leva a uma

queda da parasitemia a níveis baixos ou mesmo níveis indetectáveis por métodos convencionais de detecção do parasito (Webster *et al.*, 2003).

Em regiões de transmissão intensa e estável, onde o *P. falciparum* é espécie predominante, os recém-nascidos são resistentes à infecção durante os primeiros três meses de vida. Essa resistência tem sido atribuída principalmente à transferência passiva de anticorpos protetores IgG da mãe imune para o feto durante a gestação (Sehgal *et al.*, 1989; Chizzolini *et al.*, 1991; Hogh *et al.*, 1995). De fato, experimentos de transferência passiva de anticorpos, realizados nas décadas de 60 e 70, demonstraram claramente que anticorpos contra as formas sanguíneas estão envolvidos na imunidade protetora (Cohen *et al.*, 1971). Estes experimentos foram posteriormente repetidos, confirmando que anticorpos IgG purificados de soros de adultos imunes, residentes em áreas hiperendêmicas, são capazes de controlar a infecção por *P. falciparum* em crianças, reduzindo a parasitemia e protegendo-as de doença grave (Sabchareon *et al.*, 1991).

Na resposta contra os estágios sanguíneos, a eliminação do parasito parece ocorrer após desenvolvimento de uma resposta específica de anticorpos a antígenos variantes de superfície (Good *et al.*, 2005). Evidências obtidas na última década mostraram que pelo menos dois mecanismos estão envolvidos, quais sejam, a participação de anticorpos opsonizantes que promovem a fagocitose de eritrócitos infectados (Garraud *et al.*, 1989; Garraud *et al.*, 1994) e a presença de anticorpos citofílicos (subclasses IgG1 e IgG3, em humanos) que promovem a inibição do crescimento do parasito intra-eritrocítico em associação com monócitos (Druilhe *et al.*, 1987; Lunel *et al.*, 1989). Entretanto, apesar dos anticorpos contra as formas sanguíneas ser um importante fator na eliminação do parasito, a imunidade mediada por células contribui nesse processo (Good *et al.*, 2005).

Pombo e colaboradores (2002) descreveram a resposta celular obtida em voluntários não-imunes após inóculo de doses ultrabaixas de formas sanguíneas do parasito, observando resposta proliferativa de células T envolvendo células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e, ainda, uma produção de citocinas, primariamente de IFN- $\gamma$ , porém não de IL-4 e IL-10, consistindo em uma resposta imunológica do tipo Th1. De fato, IFN- $\gamma$  e células CD4<sup>+</sup> são capazes de ativar macrófagos que fagocitariam eritrócitos infectados e



merozoítos livres (Stevenson *et al.*, 2004). Além disso, foi observada também uma alta concentração da atividade da enzima óxido nítrico sintase em células mononucleares do sangue periférico em indivíduos subsequentemente desafiados com o parasito (Pombo *et al.*, 2002).

Ao contrário do demonstrado para infecções por outros patógenos intracelulares, incluindo vírus (Lehner *et al.*, 2007), bactérias (Medzhitov, 2007) e alguns protozoários (Hondowicz *et al.*, 1999; Golgher *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 2007), em que o papel da resposta imune inata tem sido claramente investigado, relativamente poucos estudos são direcionados para a resposta inata à malária. As interações iniciais entre estágios sanguíneos do parasito e as células do sistema imune inato são consideradas importantes para moldar a resposta imune adaptativa contra a infecção (Ing *et al.*, 2006). Além disso, a resposta imune inata é essencial não somente para limitar a fase inicial de multiplicação do parasito como também a primeira onda de parasitemia, controlando a infecção até que a imunidade adaptativa seja estabelecida (Stevenson *et al.*, 2004). A indução dos mecanismos que caracterizam a imunidade inata independe do contato prévio do hospedeiro com o patógeno, indicando que sua ativação é mediada por moléculas conservadas entre as diferentes espécies ou cepas do microorganismo (Stevenson *et al.*, 2004). Essas moléculas conservadas, denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), interagem com receptores semelhantes a Toll (TLRs) presentes nas células do sistema imune (Coban *et al.*, 2005). A ativação dos TLRs induz a ativação de genes que leva a uma produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação de peptídeos antimicrobicidas e também a um aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e do complexo de histocompatibilidade (MHC) (Akira *et al.*, 2004; Gazzinelli *et al.*, 2004). Certos componentes do *Plasmodium* são capazes de ativar TLRs resultando em uma regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias que em altas concentrações podem induzir a patogênese na infecção malárica. A âncora de GPI (glicofosfatidilinositol) que é expressa na membrana de merozoítos é reconhecida principalmente pelo TLR1, TLR2 e, menos extensivamente, por TLR4 em células dendríticas, monócitos e células B. Esse reconhecimento induz uma cascata de sinalização intracelular desencadeando uma produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 em macrófagos de camundongos e em PBMCs

de humanos infectados por *Plasmodium* (Nebl *et al.*, 2005). A hemozoína, um pigmento insolúvel, produto da degradação da hemoglobina pelo parasito, provavelmente contaminada com o DNA desse microorganismo, ativa células dendríticas via interação com TLR9 aumentando a produção de citocinas inflamatórias (Coban *et al.*, 2005; Parroche *et al.*, 2007).

Dentre os componentes envolvidos na imunidade inata se encontram as células “Natural Killer” (NK), células NKT, células T  $\gamma\delta$ , os macrófagos e as células dendríticas. A localização das células NK na medula óssea, baço e sangue periférico permite que essas células tenham maior probabilidade de contato com eritrócitos parasitados.

Na resposta imune inata, as células NK representam uma importante fonte inicial de IFN- $\gamma$  e são responsáveis pela eliminação do parasito devido aos processos de citotoxicidade desencadeados em resposta ao parasito (Ojo-Amaize *et al.*, 1984; Doolan *et al.*, 1999; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2002). Tanto as células NKT quanto as células T  $\gamma\delta$  contribuem para imunidade antimalárica, desempenhando papel crucial no desenvolvimento das respostas inata e adaptativa (Stevenson *et al.*, 2004). Enquanto as células NKT atuam contra o desenvolvimento de formas pré-eritrocíticas em hepatócitos (Schmiege *et al.*, 2003), as células T  $\gamma\delta$  são encontradas em maior número nas infecções agudas por *P. falciparum* e *P. vivax*, desencadeiam a produção de IFN- $\gamma$ , e possuem funções antiparasitárias (Elloso *et al.*, 1994; Langhorne *et al.*, 1994; Hensmann *et al.*, 2001). Durante a infecção por *Plasmodium*, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos, os macrófagos apresentam um importante papel na imunidade inata devido a sua habilidade de fagocitar eritrócitos infectados na ausência de anticorpos específicos citofílicos e/ou opsonizantes, em uma interação envolvendo o receptor de superfície CD36 e a proteína PfEMP-1 (*P. falciparum*-encoded erythrocyte membrane protein 1) (Serghides *et al.*, 2003).

Existe um consenso de que a resposta imune efetiva para controlar a infecção malárica seja decorrente da ação de anticorpos e resposta imune celular (Walther *et al.*, 2009). Um possível mecanismo de resposta imune protetora contra a malária é iniciado quando células apresentadoras de antígenos, células dendríticas e/ou macrófagos, internalizam o parasito ou parte dele, faz o seu processamento e apresenta, via MHC de classe II, um peptídeo que será reconhecido especificamente

pelo TCR das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. O ambiente pró-inflamatório gerado pela citocina IL-12 desencadeia fatores de transcrição do tipo STAT-4 e T-bet que resulta na diferenciação de células Th1 que, em última instância, produzem IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Essas duas citocinas agem sinergicamente ativando macrófagos que também produzirão reativos de oxigênio e nitrogênio levando à morte do parasito (Plebanski *et al.*, 1999; Bejon *et al.*, 2007; Wykes *et al.*, 2008).

A resposta gerada contra infecção malárica é similar a vários outros patógenos, no que se refere a resposta imune efetora pró-inflamatória gerada para eliminar o parasito, e essa resposta é também propícia a causar danos no tecido do hospedeiro (Riley *et al.*, 2006; Walther *et al.*, 2009). O sistema imune do hospedeiro evoluiu de forma que uma variedade de mecanismos, coletivamente chamado de regulação, atue ativamente para controlar essa resposta imune pró-inflamatória exacerbada e evitar danos ao hospedeiro. Alguns estudos têm demonstrado uma imunossupressão transiente durante a infecção aguda de malária, e isso afeta a resposta celular e humoral frente a aloantígenos, patógenos, toxinas de bactérias e mitógenos. Além disso, está associada a uma maior incidência de infecções bacterianas e virais, reduzindo também a resposta vacinal durante a malária grave (Weidanz, 1982; Millington *et al.*, 2006; Sakaguchi *et al.*, 2007; Scholzen *et al.*, 2010). Nossa compreensão a respeito do desenvolvimento da imunorregulação e imunopatologia na malária permanece incompleta. As células dendríticas, células T reguladoras, além de produção de citocinas imunossupressoras podem ter papel fundamental nessa regulação da resposta imune pró-inflamatória exacerbada que ocorre em indivíduos que desenvolvem malária grave (Riley *et al.*, 2006; Bejon *et al.*, 2007; Wykes *et al.*, 2007a; Walther *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2010).

#### **1.4. Células dendríticas**

Um dos componentes da resposta imune ainda pouco explorado na malária humana são as células dendríticas, responsáveis pela iniciação da resposta pró-inflamatória após apresentação de antígenos para as células T do hospedeiro

(Langhorne *et al.*, 2004). Durante a última década, enfoque tem sido dado à importância das células dendríticas na iniciação da resposta imune adaptativa e definição do tipo da resposta imunológica (Banchereau *et al.*, 2000). As células dendríticas são as únicas células apresentadoras de antígenos capazes de ativar células T não-primadas (Banchereau *et al.*, 1998). Além disso, tem se tornado evidente que as células dendríticas desempenham um papel crítico na amplificação da resposta imune inata, particularmente estimulando a ativação de células NK (Ferlazzo *et al.*, 2002; Gerosa *et al.*, 2005). Dessa forma, as células dendríticas também possuem um papel central tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa (Stevenson *et al.*, 2004).

Os principais estudos associando a infecção malárica e o papel de células dendríticas têm sido realizados em modelo murino (Seixas *et al.*, 2001; Luyendyk *et al.*, 2002; Ocana-Morgner *et al.*, 2003; Wykes *et al.*, 2007b; Wykes *et al.*, 2008). Alguns estudos realizados em infecções por cepa não letal de *P. chabaudi* demonstraram que as células dendríticas foram capazes de secretar citocinas do tipo IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40 (Pouniotis *et al.*, 2005; Ing *et al.*, 2006), e que também apresentavam total capacidade funcional *in vivo* após 6 dias de infecção. As células dendríticas também apresentavam uma regulação positiva na expressão de moléculas coestimulatórias como CD40, CD54 (ICAM-1) e CD86, que é necessária para que ocorra ativação de células T, e subsequente migração de células dendríticas da zona marginal do baço para regiões de células T (Seixas *et al.*, 2001; Leisewitz *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 2004). Em outros estudos já foi demonstrado existir uma redução desta apresentação, que decorre em diminuição da proliferação de células T (Millington *et al.*, 2006; Wykes *et al.*, 2007c). Um resultado interessante apresentado por Ocana-Morger e colaboradores (2003) demonstrou que as células dendríticas parecem ser responsáveis pela inibição da resposta de células T CD8<sup>+</sup>; a maturação de células dendríticas derivadas de medula óssea é inibida e a sobrevivência de células dendríticas é aumentada após sua exposição aos parasitos sanguíneos. Além disso, esses autores demonstraram que o padrão de secreção de citocinas por células dendríticas é profundamente modificado após contato com o parasito, e que somente as formas sanguíneas são responsáveis pela inibição de células T CD8<sup>+</sup>.

Foi demonstrado recentemente, por Wykes e colaboradores (2007), que existe uma dicotomia no fenótipo e função das células dendríticas quando essas entram em contato com cepas letais e não letais de *Plasmodium*. Quando em contato com as cepas não letais, as células dendríticas apresentaram-se completamente funcionais e capazes de secretar altos níveis de citocinas IL-12. Quando essas células foram transferidas para camundongos virgens, e esses desafiados com cepa letal, os animais foram capazes de sobreviver a infecção mediante produção de IL-12 (Wykes *et al.*, 2007c). Em contraste, camundongos infectados com cepas letais de *P. yoelii*, *P. vinckei* e *P. berghei*, apresentaram células dendríticas com déficit funcional incapazes de primar células T e secretar IL-12 (Wykes *et al.*, 2007d).

Alguns estudos visam à compreensão do papel das células dendríticas humanas na resposta a antígenos de plasmódios (Urban *et al.*, 2003; Vichchathorn *et al.*, 2006). Um estudo consistente com os achados em modelo murino demonstra que eritrócitos infectados por *P. falciparum*, quando cultivados *in vitro* com células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico, inibem sua maturação e sua subsequente habilidade em ativar células T após o contato direto por citoaderência (Urban *et al.*, 1999). Essa citoaderência de eritrócitos infectados a células dendríticas resultaram no aumento da secreção de IL-10 e inibição de células T CD4<sup>+</sup> primárias e secundárias (Urban *et al.*, 2001b). Outro estudo demonstrou que células dendríticas circulantes no sangue periférico de crianças quenianas que apresentaram malária falciparum grave ou moderada tiveram expressão de HLA-DR diminuída em comparação a crianças saudáveis, apesar de não ser observada alteração no número total dessas células (Urban *et al.*, 2001a). Para *P. vivax*, foi demonstrado que células dendríticas estimuladas por esporozoítos foram capazes de ativar linfócitos citotóxicos, levando a uma eliminação específica de hepatócitos infectados (Vichchathorn *et al.*, 2006). Em um outro estudo realizado na Tailândia, foi verificado que indivíduos infectados com *P. vivax* apresentaram diminuição da população de células dendríticas no sangue circulante, indicando imunossupressão durante a infecção (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008).

O efeito da malária na biologia das células dendríticas é ainda bastante controverso, e isso ocorre devido à complexidade do parasito e também da biologia das

células dendríticas. Algumas questões relevantes para o entendimento da interação do parasito com essas células ainda precisam ser respondidas. Contudo, novas perspectivas nos mecanismos de ativação e modulação já foram demonstrados em modelos murinos, mas ainda são necessários novos estudos na infecção humana para determinar o papel dessas células na modulação ou supressão da resposta imune antimalárica.

### **1.5. Células T reguladoras**

As células T reguladoras (Treg) naturais foram inicialmente descritas como uma população única de CD4<sup>+</sup> que previnem expansão de linfócitos autoimunes e subsequente doença autoimune (Sakaguchi *et al.*, 1995). A presença de células T reguladoras em humanos foi inicialmente descrita como sendo células caracterizadas pela modulação em resposta a estímulos policlonais, e elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação celular, através de mecanismo de contato célula-célula (Baecher-Allan *et al.*, 2001). Essas representam 3-5% do total de células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico, e são classicamente definidas pela expressão constitutiva de CD25 (cadeia- $\alpha$  do receptor de IL-2) (Belkaid *et al.*, 2005). Contudo, podem ser também definidas pela expressão de CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein*), OX40, CD39 e CD73, além de altos níveis de FR4 (*folate receptor*), CD62L, CD45RO, e ausência de CD127; entretanto, nenhum desses marcadores é específico para células T reguladoras naturais, uma vez que podem ser expresso por células T ativadas. A expressão do fator de transcrição FoxP3 é a assinatura definitiva dessas células em camundongos, e em humanos a sua expressão é regulada de forma transiente em células T ativadas (Shevach *et al.*, 2006a; Belkaid, 2007; Deaglio *et al.*, 2007; Belkaid *et al.*, 2010).

As células Tregs são classificadas em células Tregs naturais (nTreg) ou Tregs induzidas (iTreg). As células Treg de ocorrência natural estão relacionadas com a manutenção da autotolerância e são de grande importância para a manutenção da homeostase do sistema imune. O processo de geração das células Treg naturais se

inicia quando os timócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> são selecionados no timo a partir de interações com peptídeos próprios apresentados por moléculas de MHC-II, onde a seleção positiva dessas células depende de interações de alta afinidade com auto antígenos expressos em moléculas de MHC. Uma vez selecionadas positivamente por meio de reconhecimento de alta afinidade de peptídeos próprios, acredita-se que produzam moléculas anti-apoptóticas que as protegem da seleção negativa (Sakaguchi *et al.*, 1995; Sakaguchi, 2004; Belkaid, 2007; Belkaid *et al.*, 2010). Essas células são comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos auto-reativos nos tecidos periféricos e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na regulação negativa da resposta imune também diante de antígenos exógenos e auto-antígenos (Fallarino *et al.*, 2003; Sakaguchi, 2004; Shevach *et al.*, 2006a; Belkaid, 2007; Sakaguchi *et al.*, 2007). As células Treg induzidas são produzidas na periferia a partir dos linfócitos T naïve recém-selecionados mediante contato com citocinas imunomodulatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ), a partir de drogas imunossupressivas, ou por células apresentadoras de antígenos (APCs) condicionadas por produtos microbianos (O'Garra *et al.*, 2004a; O'Garra *et al.*, 2004b; Hansen *et al.*, 2010).

Apesar de extensivos estudos em vários modelos experimentais, os mecanismos pelos quais as células Treg interferem na resposta imune efetora não estão totalmente elucidados. Alguns mecanismos podem ser destacados, como: a inibição indireta pela modulação da função das células dendríticas (Tang *et al.*, 2006); a inibição direta de células por contato célula-célula ou pela produção de citocinas anti-inflamatórias; pela produção ou secreção das citocinas TGF- $\beta$  e IL-10, que contribuem para a atividade supressora *in vivo* (von Boehmer, 2005). Além disso, foi demonstrado que a molécula de CTLA-4, expressa pelas Tregs, induz a expressão de indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), que por sua vez degrada o aminoácido essencial triptofano; a carência deste aminoácido inibe a ativação de células T e, ainda, promove sua apoptose (Fallarino *et al.*, 2003). Finalmente, alguns estudos demonstram que a adenosina e a molécula de cAMP contribuem para a atividade supressora das Tregs (Bopp *et al.*, 2007; Deaglio *et al.*, 2007).

Na infecção pelo *Plasmodium* a resposta imune celular tem um papel dúbio, uma vez que produz citocinas pró-inflamatórias efetoras que levam a morte do parasito, mas

também pode gerar uma excessiva produção dessas citocinas, que em última instância poderão gerar inflamação grave causando danos ao hospedeiro. Alguns estudos em modelos murinos têm investigado se as células Treg teriam papel na modulação desses mecanismos efetores responsáveis em controlar a parasitemia (Hansen *et al.*, 2010). Foi demonstrado em infecções experimentais, usando *P. yoelii*, que a depleção de Tregs em camundongos BALB/c levou a uma diminuição da carga parasitária e também impediu a morte do hospedeiro (Hisaeda *et al.*, 2004; Couper *et al.*, 2008). Em estudo subsequente com cepa letal e não-letal de *P. yoelii*, foi observado a ocorrência da ativação e expansão de células Tregs (Couper *et al.*, 2008). Outro estudo utilizando *P. berghei* NK 65 em camundongos BALB/c demonstrou que a depleção com anticorpos anti-CD25 resulta em um atraso no aumento da parasitemia (Long *et al.*, 2003). O papel das células Tregs na indução da malária cerebral em camundongos C57BL/6, CBA e BALB/c é ainda bastante controverso. Alguns estudos utilizando depleção de células Tregs verificaram redução da parasitemia, aumento da ativação de células T, aumento da produção de IFN- $\gamma$  e proteção de malária cerebral (Amante *et al.*, 2007; Vigarito *et al.*, 2007). Por outro lado, outros estudos não foram capazes de determinar redução da parasitemia, apesar do aumento da ativação de células T (Nie *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2008).

Em infecções humanas poucos estudos investigaram o papel das Tregs, e isso pode ser consequência da complexidade de se trabalhar com amostras humanas. Uma variedade de fatores, incluindo elaboração do estudo de coorte, acesso e recrutamento de indivíduos infectados, além da utilização de células frescas e/ou preservadas, podem influenciar nos resultados e consequentemente no tipo de conclusão acerca da resposta imune antimalárica. Em um estudo realizado por Walther e colaboradores (2005) foi observado um aumento da expressão de RNA mensageiro codificante para FoxP3 e também uma maior expressão de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD69<sup>-</sup> após infecção experimental por meio de picadas de mosquitos infectados com *P. falciparum*. Além disso, indivíduos com maior número de células Treg apresentaram maior parasitemia quando comparados aos indivíduos que apresentaram baixa frequência de células Treg circulantes. Em indivíduos naturalmente infectados no Quênia foi observada uma correlação positiva entre número de células Treg no sangue periférico



e aumento do risco de apresentar malária clínica. A maioria das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expressavam FoxP3, sugerindo que as células T reguladoras naturais podem atuar de forma negativa na aquisição da imunidade contra a malária (Todryk *et al.*, 2008).

Estudo realizado com etnias diferentes no oeste da África verificou que, apesar da similaridade dos níveis de exposição, indivíduos da etnia Fulani mostraram-se mais resistentes à infecção por *Plasmodium*, uma vez que apresentavam baixos níveis de parasitemia e também menor incidência de episódios clínicos de malária. De forma interessante, ao avaliar a expressão de genes envolvidos na resposta imune em PBMCs de indivíduos dos dois grupos simpátricos Fulani e Mossi, observou-se um aumento da expressão de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-18 e TBX21 (Th1) em indivíduos Mossi, enquanto que na população de Fulani, resistente à malária, foi verificada uma maior expressão gênica de citocinas IL-4 e IL-9, e maior expressão do fator de transcrição intracelular (GATA3). Além disso, houve uma correlação entre maior expressão de genes ligados a imunidade, menores níveis de células Treg circulantes e menor expressão de CTLA-4 e TGF- $\beta$  no sangue periférico dos indivíduos de Fulani. Realizada a depleção de células Treg em culturas de PBMCs dos indivíduos de Fulani, não se verificou alteração na taxa de proliferação de linfócitos, sugerindo que o déficit funcional das células Treg pode estar associado a uma menor susceptibilidade à malária por esse grupo de indivíduos de Fulani (Torcia *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado em Gâmbia, crianças com malária grave e malária não complicada apresentaram número e fenótipos similares de células Treg no sangue circulante, apesar de crianças com malária grave apresentarem uma maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias. Esses resultados sugerem que células Treg não são capazes de regular negativamente a resposta Th1, que demonstrou ser exacerbada nesses indivíduos com malária grave (Walther *et al.*, 2009).

No oeste da Papua Nova Guiné foi observado um aumento de células Treg no sangue circulante de indivíduos infectados por *P. falciparum* e, em pacientes com malária grave, foi verificada uma correlação entre frequência dessas células e nível de parasitemia. Além disso, as células Treg de indivíduos com malária grave apresentavam maior expressão de TNFR2, em populações FoxP3<sup>hi</sup>, aparentando exercer uma forte função supressiva (Minigo *et al.*, 2009). Em estudo recente realizado

com células de indivíduos saudáveis, estimuladas com eritrócitos infectados de *P. falciparum*, foi demonstrada a indução e a expansão de duas subpopulações distintas de Tregs. Uma apresentou expressão intermediária de FoxP3, com a secreção de citocinas efetoras (IL-17, IL-4, IFN- $\gamma$ ); outra população apresentou alta expressão de FoxP3<sup>hi</sup>, que levou à redução de citocinas pró-inflamatórias em um sistema de cocultura, o que sugere que as Treg FoxP3<sup>hi</sup> têm um papel fundamental na inibição da resposta imune efetora (Scholzen *et al.*, 2009). Em indivíduos infectados por *P. vivax*, na Tailândia, foi observada uma expansão das células Treg no sangue periférico, durante a fase aguda, e uma maior expansão dessas células em culturas de PBMCs estimuladas por antígeno bruto do parasito (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008)

Evidências em modelos murino e em humanos sugerem que as células Treg se expandem e se ativam durante a infecção malárica. Entretanto, não está completamente elucidado se essa expansão ocorre diretamente da proliferação, do tipo de citocinas presentes no ambiente, ou ainda se resulta de recrutamento de órgão linfóide secundário. Em relação ao entendimento da regulação da resposta imune efetora em infecções por *P. Vivax*, pouco ainda é conhecido. Mais estudos ainda são necessários para determinar o papel das células Treg em populações expostas a essa infecção.

### **1.6. Células Th17**

Diferentes tipos de células T auxiliares CD4<sup>+</sup> se desenvolvem a partir de células T virgens quando submetidas a estímulos antigênicos, as quais podem ser caracterizadas pela produção distinta de citocinas e mecanismos efetores (Bettelli *et al.*, 2007). Células CD4<sup>+</sup> Th17 se distinguem por produzirem citocinas IL-17 (IL17A e IL-17F), que por sua vez induzem o recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação e a produção de quimiocinas e peptídeos antimicrobicidas pelos tecidos celulares (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Iwakura *et al.*, 2008). O receptor ROR $\gamma$ t foi identificado no modelo murino como chave na orquestração da diferenciação de células Th17, que são induzidas por citocinas do tipo IL-6 e TGF- $\beta$  (Yang *et al.*, 2007). Essas

células têm se destacado por seu papel predominante na patogênese de doenças inflamatórias crônicas e também nas doenças autoimunes (Iwakura *et al.*, 2008; Miyazaki *et al.*, 2010). Estudos recentes têm enfatizado o papel da IL-17 nos mecanismos imunes desencadeados durante infecções por fungos, bactérias e protozoários. Essa citocina é capaz de estimular fibroblastos e células endoteliais a produzir múltiplos mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , óxido nítrico sintase 2, metaloproteases e quimiocinas (Iwakura *et al.*, 2008; Bacellar *et al.*, 2009; Ishida *et al.*, 2010; Miyazaki *et al.*, 2010).

Em relação ao papel das Th17 em infecções por protozoários, poucos estudos foram realizados para determinar o papel patogênico ou protetor desencadeado pela ação dessas células durante essas infecções parasitárias. Resultados controversos indicam a importância das células Th17 na proteção contra a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi*, conforme demonstrado em camundongos geneticamente deficientes para a citocina IL-17A (*il-17a<sup>-/-</sup> knockout*) (Miyazaki *et al.*, 2010). No entanto, na leishmaniose cutânea humana foi observado um aumento nos níveis de produção de IL-17 em linfócitos de pacientes infectados, e uma correlação entre número de células expressando IL-17 e a presença de inflamação na lesão, sugerindo o papel dessa citocina na patogênese da infecção (Bacellar *et al.*, 2009). Dentre os Apicomplexa, os estudos acerca do papel das células Th17 ainda se restringem a infecções experimentais. Para a infecção por *Toxoplasma gondii* foi demonstrado o aumento da expressão de IL-17, após a infecção, e uma proteção parcial após a neutralização dessa citocina (Guiton *et al.*, 2010). A produção de IL-17 durante a toxoplasmose seria realizada pelas células NK, após estímulo da citocina IL-6 (Passos *et al.*, 2010). Em malária, Ishida e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos geneticamente deficientes para IL-17 também desenvolveram malária cerebral induzida por *P. berghei* ANKA, sugerindo que essa citocina não esteja envolvida na patogênese da malária cerebral. Pouco ainda é conhecido sobre a ação das células Th17 tanto na patogênese quanto na proteção da malária.

### **1.7. Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) como potencial candidato vacinal**

Desde a década de 60, casos de resistência às drogas, como cloroquina, mefloquina e primaquina, utilizadas contra a malária, vêm sendo reportados (Alecrim *et al.*, 1982; Alecrim *et al.*, 1999; Baird, 2007). Assim, novas alternativas de controle têm sido estudadas. Dentre elas, uma vacina eficaz seria considerada uma medida de maior custo-benefício para controle dessa infecção (Good *et al.*, 2005). Contudo, apesar dos avanços tecnológicos obtidos neste campo de pesquisa, vacinas eficazes contra malária ainda não estão disponíveis (Kocken *et al.*, 1999; Wykes *et al.*, 2007a). O desenvolvimento de vacinas contra a malária, sobretudo na busca de imunógenos efetivos e de baixo custo, representa um desafio científico significativo no controle dessa infecção. Entretanto, seu progresso ainda é limitado pela complexidade do ciclo de vida do *Plasmodium*, que resulta em uma resposta imunológica específica para cada forma evolutiva, e pelo fato do parasito ter desenvolvido diversas estratégias de escape à resposta imune do hospedeiro (Good *et al.*, 2005).

Atualmente os esforços para o desenvolvimento de vacinas contra a malária têm sido focados na infecção por *P. falciparum*, uma vez que menos de 10% dos antígenos vacinais testados em ensaios clínicos são específicos para *P. vivax*. Considerando principalmente a importância da malária vivax, um maior investimento no desenvolvimento de vacinas para esta infecção se faz necessário (Moorthy *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2007).

Diversos antígenos de estágios assexuados sanguíneos têm despertado interesse como alvos potenciais de uma possível vacina protetora. Dentre esses antígenos, a proteína AMA-1 (*apical membrane antigen*) tem se destacado como um dos principais objetos de diferentes estudos em malária vivax (Herrera *et al.*, 2007).

O antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) é uma proteína de 83 kDa sintetizada por estágios sanguíneos maduros do parasito e também por esporozoítos (Silvie *et al.*, 2004), sendo localizado inicialmente nos micronemas (Kocken *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2005). A estrutura primária deduzida da sua sequência gênica sugere que o AMA-1 apresenta características estruturais de uma proteína integral de membrana tipo

1, com um curto domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática na região C-terminal (Peterson *et al.*, 1989; Pizarro *et al.*, 2005). Em todos os genes caracterizados de AMA-1 de *Plasmodium*, 16 resíduos invariantes de cisteína estão codificados na região ectoplasmática, e a análise do padrão de pontes dissulfeto sugere uma divisão em três domínios distintos, I II e III, que são estabilizados, respectivamente, com três, duas e três pontes dissulfeto (Hodder *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 2002).

Antes da invasão dos merozoítos nos eritrócitos a proteína AMA-1 é processada em um produto de 66 kDa e então liberada na superfície do merozoíto momentos antes ou durante o processo de invasão (Nair *et al.*, 2002; Pizarro *et al.*, 2005). O grau de conservação constatado entre as sequências desta proteína implica que sua função biológica seja conservada entre as diferentes espécies de *Plasmodium* (Li *et al.*, 2002) e talvez entre outros apicomplexa (Chesne-Seck *et al.*, 2005).

Acredita-se que umas das suas funções seja facilitar a reorientação do merozoíto após adesão inicial, de modo que as roptrias e os complexos de micronemas sejam expostos na superfície dos eritrócitos durante a invasão do parasito (Chitnis *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2004), ou ainda, iniciar o contato entre o parasito e o eritrócito, ação dependente da ligação de proteínas Duffy (Mitchell *et al.*, 2004). Treeck e colaboradores (2009) demonstraram que essa proteína tem um papel essencial no movimento de junção e que a fosforilação do domínio citoplasmático é um pré-requisito para a invasão do parasito no eritrócito (Treeck *et al.*, 2009). Além disso, a análise cristalográfica da AMA-1 de *P. vivax* revelou que os seus domínios I e II são estruturalmente similares entre si e pertencem à superfamília PAN de proteínas. Esses domínios PAN fazem parte de proteínas micronemais de Apicomplexa, que desempenham importante papel na invasão do hospedeiro (Pizarro *et al.*, 2005).

O potencial antigênico da proteína AMA-1 foi observado, inicialmente, após a imunização de macacos *Rhesus* com a proteína nativa purificada de *P. knowlesi* (PK66), a qual foi capaz de induzir proteção parcial contra infecção (Deans *et al.*, 1988). Além disso, imunizações experimentais em roedores e primatas, utilizando-se a proteína recombinante AMA-1, evidenciaram proteção contra malária (Kocken *et al.*, 2002; Stowers *et al.*, 2002). Ensaios clínicos de Fase 1, realizados em humanos,

demonstraram que AMA-1 de *P. falciparum*, expressa tanto em *Pichia pastoris* quanto em *Escherichia coli*, associada a adjuvantes do tipo Alhydrogel ou AS02A, é segura e imunogênica, desencadeando potente resposta humoral, celular e de citocinas do tipo IFN- $\gamma$  e IL-5 quando administrada em indivíduos adultos saudáveis nunca expostos à infecção (Malkin *et al.*, 2005; Dicko *et al.*, 2007; Polhemus *et al.*, 2007). Verificou-se também nesses estudos o desencadeamento de atividade biológica contra malária em ensaio de inibição de invasão *in vitro* (Malkin *et al.*, 2005).

Na África, em estudo soropidemiológico observou-se que crianças maiores de dois anos e adultos apresentavam anticorpos que reconhecem uma proteína recombinante correspondente a AMA-1 de *P. falciparum*, a PF83 (Thomas *et al.*, 1994). No Quênia, estudo longitudinal realizado em população residente em área endêmica para *P. falciparum* observou uma considerável proporção de indivíduos portadores de anticorpos naturalmente adquiridos e reatividade celular frente a AMA-1 (Udhayakumar *et al.*, 2001).

Dos poucos estudos soropidemiológicos descritos na literatura, a maioria tem sido realizada em áreas holo-hiperendêmicas e utilizam como alvo a AMA-1 de *P. falciparum*. No Brasil, a resposta contra AMA-1 de *P. vivax* (Pv-AMA-1) foi avaliada em indivíduos expostos à transmissão em regiões do Estado do Pará; a proteína foi reconhecida por grande parte de indivíduos naturalmente expostos (85%), apresentando predomínio da resposta do tipo IgG1 (Rodrigues *et al.*, 2005). Outro estudo realizado no Brasil por nosso grupo (Morais *et al.*, 2006) demonstrou que a proteína AMA-1 de *P. vivax* é naturalmente imunogênica em indivíduos que apresentam diferentes graus de exposição a infecção por malária. Neste estudo, observou-se que a prevalência e os níveis de IgG, IgG1 e IgG3 anti-Pv-AMA-1 aumentam com o tempo de exposição à infecção. Além disso, a frequência de resposta positiva e os níveis de IgG foram maiores em áreas onde a prevalência de malária apresentou maior intensidade (Morais *et al.*, 2006). Com fulcro nessas evidências de alto reconhecimento da proteína Pv-AMA-1 em indivíduos com diferentes graus de exposição ao *P. vivax*, Múfalo e colaboradores realizaram estudo em que se verificou que a região do domínio II (DII) apresentou semelhança no grau de reconhecimento de anticorpos IgG em indivíduos infectados em comparação aos níveis detectados contra

o ectodomínio (AMA-1) (Mufalo *et al.*, 2008). Esse mesmo grupo demonstrou a imunogenicidade do DII de Pv-AMA-1, em conjugação com diferentes formulações de adjuvantes, o que está a indicar que o DII deve continuar sendo avaliado como parte de uma vacina de subunidade (Gentil *et al.*, 2010).

O polimorfismo dessa proteína ocorre de forma não-aleatória na região codificadora dentro do ectodomínio, especialmente no domínio I (domínio mais polimórfico), sugerindo que essa região seja o principal alvo da resposta imune (Natarajan *et al.*, 2001). Esse polimorfismo pode ser determinante para a morbidade da doença, uma vez que já foi demonstrado forte associação entre a forma clínica e os resíduos Glu<sub>187</sub> e Glu<sub>243</sub> no gene AMA-1 de *P. falciparum* (Franke-Fayard *et al.*, 2004), e entre trombocitopenia e a presença dos resíduos Y<sub>193</sub> e S<sub>210</sub> (Grynberg *et al.*, 2007).

Grosso modo, apesar de AMA-1 constituir em alvo potencial para uma vacina protetora contra malária, existem poucos relatos sobre a caracterização da resposta imune de humanos contra esta proteína. A maioria dos estudos até então realizados têm como foco a resposta imune humoral, o que nos leva a acreditar que estudos direcionados para o entendimento da interação entre antígenos vacinais e a resposta imune humoral e também celular do hospedeiro seriam necessários para determinar o papel dessas proteínas na geração de uma resposta imune protetora.

## 2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, a malária é endêmica na Amazônia brasileira, com a ocorrência de transmissão simultânea do *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, sendo *P. vivax* a espécie prevalente, responsável por cerca de 80% dos casos registrados (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). A infecção debilitante por *P. vivax* tem causado um profundo impacto na saúde pública (Mendis *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2009), na longevidade e na prosperidade de grande parte da população humana. Além disso, recentemente foi demonstrado que a infecção por essa espécie pode ser fatal, levando a casos de anemia grave, agregação de plaquetas, citoaderência no pulmão e também trombocitopenia (Mendis *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2003; Barcus *et al.*, 2007; Genton *et al.*, 2008; Tjitra *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010). Ao contrário do que ocorre para o *P. falciparum*, que pode ser facilmente cultivado *in vitro*, o cultivo de *P. vivax* ainda é restrito a poucos laboratórios (Golenda *et al.*, 1997), o que limita os estudos sobre os mecanismos imunológicos que operam durante a infecção por esta espécie.

Embora a infecção por *Plasmodium* resulte em uma resposta imunológica que reduz a carga parasitária (Good *et al.*, 2005), a sobrevivência do parasito no hospedeiro é decorrente do processo de evasão da resposta imune específica contra ele. Uma das características marcantes nesse processo seria a diminuição da reatividade celular específica, evento já demonstrado para populações residentes em áreas de transmissão de malária após exposição contínua no Brasil (Braga *et al.*, 2002b), o que sugere uma supressão específica da resposta imunológica desencadeada pelo parasito. Entretanto, os mecanismos envolvidos na diminuição da função da resposta celular após a infecção ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns dos maiores obstáculos para indução de uma resposta imune protetora incluem o polimorfismo antigênico, o reconhecimento limitado de antígenos/candidatos à vacina, a inibição da função de células dendríticas e a apoptose de células T e B efetoras ou de memória. De fato, já foi demonstrado que eritrócitos infectados por *Plasmodium* ocasionam alteração da função de células apresentadoras de antígeno (Urban *et al.*, 1999; Urban *et al.*, 2001a). Além disso, em modelo murino, foi descrito



que a infecção por *Plasmodium* pode causar apoptose de células T CD4+ Th1 (Good *et al.*, 2005) e a inibição de células T CD8+ (Ocana-Morgner *et al.*, 2003). Para *P. vivax*, os mecanismos imunológicos envolvidos no processo de evasão e a associação destes com diferentes graus de morbidade ainda não estão totalmente esclarecidos. Além disso, estudos ainda são necessários para determinar o papel de frações do parasito, como proteínas recombinantes, no padrão de resposta imune e morbidade de pacientes infectados por *P. vivax*.

No presente trabalho avaliamos aspectos da resposta imune celular e humoral de pacientes infectados por *P. vivax* frente ao antígeno recombinante Pv-AMA-1, candidato a compor uma vacina antimalárica. Além disso, estabelecemos associações entre a resposta imune específica e morbidade/parasitemia na malária vivax.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. *Objetivo geral*

Caracterizar diferentes parâmetros da resposta imune celular e humoral em pacientes infectados por *P. vivax*.

#### 3.2. *Objetivos específicos*

- Avaliar o perfil fenotípico e funcional de células dendríticas derivadas de monócitos diferenciadas na presença do antígeno Pv-AMA-1 de *P. vivax*;
- Avaliar a produção de citocinas (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-12p40) em sobrenadantes de culturas de PBMCs estimuladas por AMA-1 de *P. vivax*;
- Determinar e caracterizar a presença e a atividade de células T reguladoras no sangue circulante de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax*;
- Determinar a presença de linfócitos Th17 circulantes no sangue periférico de pacientes infectados com *P. vivax*;
- Avaliar *in silico* a predição de possíveis epitopos de células B na proteína Pv-AMA-1;
- Caracterizar o perfil de resposta humoral de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax* (IgG e subclasses), frente a Pv-AMA-1 (Ectodomínio), DII de Pv-AMA1 e o peptídeo predito *in silico*;
- Detectar possíveis associações entre anemia, plaquetopenia e níveis de parasitemia ao padrão de resposta imunológica de pacientes infectados por *P. vivax*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. *Indivíduos e área de estudo*

Foram selecionados para este estudo 214 indivíduos, de ambos os sexos, residentes na área endêmica brasileira que apresentavam número variável de episódios prévios de malária por *P. falciparum* e/ou *P. vivax*. Todos os 190 indivíduos apresentavam infecção patente por *P. vivax* diagnosticada no exame de gota espessa, sendo que 117 destes indivíduos consistiam de pacientes atendidos no Hospital Universitário Júlio Müller em Cuiabá, capital do Estado do Mato Grosso (MT) e o restante (73 indivíduos), pacientes que procuraram atendimento na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, localizada em Manaus (FMT-AM), Estado do Amazonas (AM).

As coletas de sangue realizadas no Hospital Universitário Júlio Müller foram obtidas em colaboração com o Prof. Dr. Cor Jésus Fernandes Fontes, para envio de amostras de plasma para posterior utilização em ensaios imunoenzimáticos. Além das amostras de plasmas, foram obtidos questionários pré-codificados, previamente elaborados, contendo informações sobre dados demográficos, história migracional, medidas de exposição à malária (tempo de residência na área endêmica, número de episódios prévios de malária, etc.), bem como hemograma completo e descrição dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes.

Na cidade de Manaus a coleta realizou-se nos meses de maio de 2008 e março de 2009, com o intuito de obter amostras de plasma, DNA e células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados com *P. vivax*. Setenta e três indivíduos adultos, do gênero masculino ou feminino, apresentando infecção patente por *P. vivax* foram então selecionados a partir do resultado obtido em exames de gota espessa realizados na rotina laboratorial da FMT-AM. Durante a coleta de sangue foi aplicado um questionário padrão para aquisição de informações sobre dados pessoais do paciente, histórico prévio de malária e sintomatologia. Além disso, para todos os pacientes foi realizado hemograma completo e determinada a parasitemia sanguínea.

Após a coleta de sangue, todos os pacientes foram tratados de acordo com a política nacional de tratamento da malária no Brasil, conforme preconizado no Manual de Terapêutica da Malária. É importante salientar que os indivíduos avaliados neste estudo não apresentavam outras enfermidades como dengue, hepatite e HIV, as quais foram descartadas após exames laboratoriais.

Como controles negativos, foram incluídos no estudo 20 indivíduos nunca expostos à malária, residentes em Belo Horizonte, área não-endêmica para a doença. De todos os indivíduos avaliados foi obtido o consentimento para participação no estudo conforme normatiza o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais em abril de 2007, Parecer ETIC60/07).

## **4.2. Antígeno**

Antígeno 1 de Membrana Apical (Pv-AMA-1), que é uma proteína recombinante de estágio sanguíneo de *P. vivax*, foi utilizada no ensaio para avaliação da resposta imune celular e humoral. O domínio II (DII) de Pv-AMA-1 foi utilizado para os ensaios de resposta imune humoral. Estes antígenos recombinantes foram gentilmente cedidos pela Dra. Irene Soares, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, USP.

### **4.2.1. Antígeno 1 da Membrana Apical de *P. vivax* (Pv-AMA-1)**

A proteína recombinante de 66 kDa, correspondente ao Antígeno 1, de Membrana Apical de *P. vivax* (Pv-AMA-1) foi produzida em *E. coli* a partir do vetor de expressão pET-22b, abrangendo as regiões codificadoras dos domínios I, II e III da proteína, como representado na Figura 4.

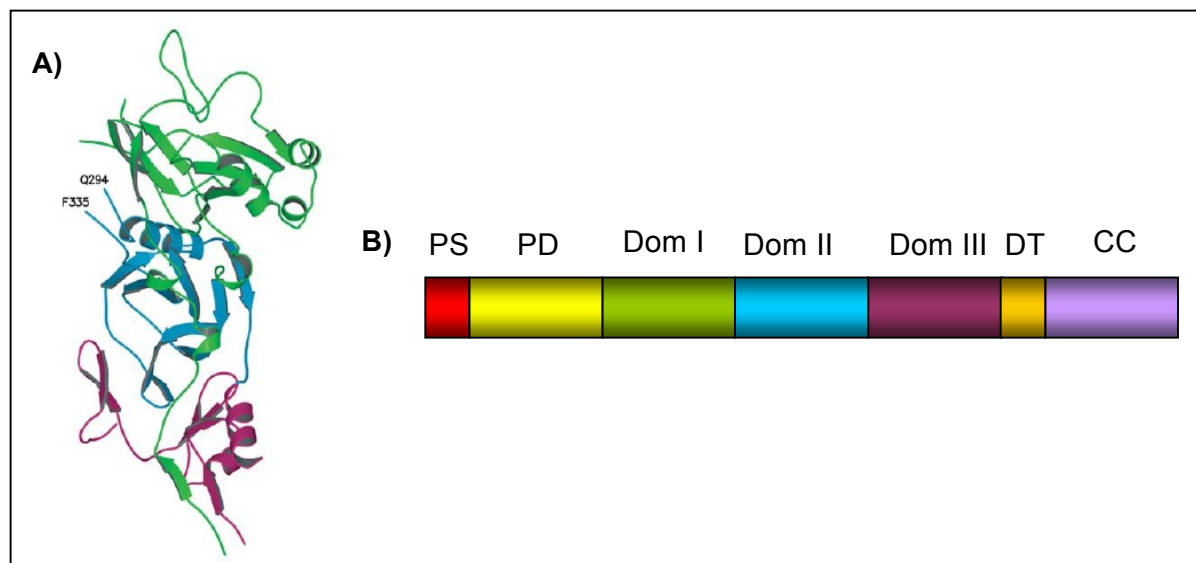


Figura 4. Antígeno de Membrana Apical 1. A) Estrutura terciária do gene PvAMA-1: verde = domínio I, azul = domínio II e verde= domínio III. Figura extraída de Pizarro *et al*, 2005). B) Esquema do Antígeno de Membrana Apical 1: PS = Peptídeo sinal, PD = Pró-domínio, Dom I = Domínio I, Dom II = Domínio II, Dom III = Domínio III, DT = Domínio transmembrano e CC = Cauda citoplasmática. Figura adaptada de Hodder *et al*, 1996.

#### 4.3. ELISA para detecção de anticorpos IgG total anti-Pv-AMA-1, DII e peptídeo

O padrão de reconhecimento de anticorpos IgG específicos para o antígeno recombinante da Pv-AMA-1 e o ectodomínio DII foi avaliado por ELISA conforme protocolo descrito a seguir. Resumidamente, microplacas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizadas com 50µL dos antígenos recombinantes em concentração de 25ng/poço (Pv-AMA-1 e DII), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6; 0,1M) por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as microplacas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T) e em seguida bloqueadas com leite desnatado (Molico - Nestlé®) a 5% em PBS/T (200µL/poço) por 2 horas a 37°C. Posteriormente, repetiu-se o processo de lavagem por quatro vezes consecutivas, e 50µL das amostras de soros diluídas a 1/100 em

PBS/T foram adicionados aos poços em duplicatas. Após o tempo de incubação de 1 hora e 30 minutos a 37°C, as placas foram novamente submetidas a quatro lavagens com PBS/T e o conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase (Sigma, EUA) diluído 1/2000 em PBS/T (50µL/poço) foi adicionado, seguindo novamente incubação a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Transcorrido este tempo, as placas foram lavadas por quatro vezes com PBS/T e a reação enzimática revelada pela adição de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride substrate – Sigma, EUA) diluído em tampão fosfato-citrato, pH 5,0 contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (50µL/poço). As placas foram incubadas a TA e protegidas da luz até a reação ser interrompida pela adição de 50µL de uma solução de 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Os valores de absorvâncias (DO) foram medidos a 492 nm utilizando leitor automático de microplacas (SpectraMax 340 PC, Molecular Devices). A absorvância discriminante entre os resultados positivos e negativos (“cut off”) foi estabelecida pela média das absorvâncias das amostras de indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de três desvios-padrão. Considerando que podem ocorrer variações diárias nas leituras da DO dos soros testados, os valores do “cut off” foram calculados em cada ensaio, que incluía cinco diferentes controles negativos em cada placa testada, além de dois soros positivos para o controle interno do teste. A média da absorvância de cada amostra testada foi dividida pelo valor do “cut off” da placa para determinar o índice de reatividade da amostra (IR), sendo os soros com IR ≥ 1 considerados positivos.

#### ***4.3.1. ELISA para detecção de subclasses de IgG total anti-Pv-AMA-1e DII***

Para detecção dos isotipos específicos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), os ensaios imunoenzimáticos foram realizados como descrito no item anterior, com exceção dos anticorpos secundários que se constituíam de anticorpos monoclonais de camundongos específicos para as diferentes classes de IgG humano (Sigma, EUA). Os monoclonais específicos para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram diluídos 1/2000 em

PBS/T, seguindo incubação por 1 hora a 37°C. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes e incubadas a 37°C por 1 hora com o conjugado anti-IgG murino ligado a peroxidase (Sigma, EUA) diluído 1/2000 em PBS/T (50µL/poço). A revelação, leitura das DOs e cálculo dos limites de positividade (“cut off”) foram realizados como descrito no item acima.

#### **4.4. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico**

Para separação dos PBMCs, aproximadamente 35 mL de sangue periférico de cada indivíduo, coletados em tubos heparinizados, foram aplicados lentamente sobre 10 mL de solução de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1.077, Sigma, EUA) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA), e foram centrifugados a 400 g por 40 minutos em temperatura ambiente. O anel contendo as células mononucleares, formado na interface entre plasma e eritrócitos, foi coletado e lavado por duas vezes a 400 g por 10 minutos com meio DMEM (Sigma, EUA). Ao final, as células foram ressuspensas para 1 mL e foi realizada a contagem das mesmas. Para contagem celular foi utilizada a câmara hemocitométrica de Neubauer, estando as células diluídas (1:20) em Solução de Turcks. O volume final foi ajustado para  $1 \times 10^7$  células/mL. As células obtidas dos pacientes da cidade de Manaus foram congeladas em nitrogênio líquido utilizando uma solução de congelamento contendo soro fetal bovino (90%) e DMSO (10%) .

#### **4.5. Diferenciação de células dendríticas na presença do antígeno recombinante Pv-AMA-1**

Para a diferenciação em células dendríticas, monócitos foram isolados a partir de suspensão de PBMC obtida conforme descrito acima.

Para o isolamento de monócitos, foi utilizada a técnica de separação celular por colunas magnéticas (MACS, magnetic activated cell sorting). Em resumo, os monócitos

(células CD14<sup>+</sup>) foram magneticamente marcados com microesferas anti-CD14. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para colunas LS e então foram colocadas em campo magnético de um separador MACS (QuadroMACS<sup>®</sup>, Miltenyi Biotec, EUA). Células não marcadas passaram pela coluna na presença de campo magnético. Após remoção da coluna do campo magnético, as células CD14<sup>+</sup> magneticamente retidas (seleção positiva) foram eluídas (PBS pH 7,2 com 0,5% BSA e 2 mM EDTA), lavadas (PBS), contadas em câmara de Neubauer, e distribuídas em tubos de poliestireno (1x10<sup>6</sup> monócitos/tubo) contendo meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10% de soro AB<sup>+</sup> humano, 40 mg/L de gentamicina e 300 mg de L-glutamina a 2 mM).

A diferenciação de monócitos foi realizada pela presença das citocinas humanas IL-4 e GM-CSF, segundo protocolo descrito por Urban et al. (1999). Resumidamente, 1 µg/mL de IL-4 e de GM-CSF (Peprotech, EUA) foram acrescentados nos dias 1, 3 e 5, em culturas com presença ou ausência dos antígenos Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1<sub>19</sub> (1 µg/tubo) adicionados nos mesmos dias de cultura, gerando células dendríticas imaturas (iDCs). No sétimo dia de cultura, as células foram maturadas na presença de 10 µg/mL de LPS (Sigma, EUA) por 48 horas, resultando em células dendríticas maduras (mDCs). As culturas em diferenciação e maturação foram mantidas em estufa umidificada a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.6. Culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

Células mononucleares do sangue periférico (5 x 10<sup>5</sup>) foram distribuídas em placas de cultura de 48 wells (Corning, USA), estimuladas com Pv-AMA-1 na concentração de 1 µg/poço, e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 1, 2, 4 e 6 dias. Culturas adicionais estimuladas com mitógeno PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma) foram realizadas como controles positivos. Para a determinação de produção de citocinas e quimiocinas, sobrenadantes foram coletados, aliquotados e estocados a - 80°C até a realização dos ensaios.



#### **4.7. Perfil fenotípico de células dendríticas diferenciadas na presença ou ausência dos antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e avaliação da apresentação de peptídeos derivados de Pv-AMA-1**

Após diferenciação e maturação, o perfil fenotípico das células dendríticas foi determinado por citometria de fluxo, avaliando a expressão de moléculas de superfície, incluindo moléculas de apresentação de antígenos (CD1a, HLA-A,B,C e HLA-DR), moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86), moléculas receptoras de imunoglobulinas (CD16 e CD64) e integrina de membrana (CD11c), esta última para determinar o processo de diferenciação. Os anticorpos utilizados foram específicos para os marcadores celulares humanos CD1a PE-Cy5 (conjugado com ficoeritrina e Cy5, fusionados), HLA-A,B,C PE (conjugado com ficoeritrina), HLA-DR PE-Cy5, CD40 PE, CD80 FITC (conjugado com isotiocianato de fluoresceína), CD86 PE, CD16 PE, CD64 FITC e CD11c PE (BD Pharmingen, EUA).

A marcação celular foi realizada pela incubação de células dendríticas diferenciadas e maturadas com os respectivos anticorpos, em temperatura ambiente por 20 minutos; lavados com PBS e centrifugados por 10 minutos a 400 g. As células marcadas foram ressuspensas em 50 µL de PBS e analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, EUA).

Para a avaliação da apresentação de peptídeos derivados de Pv-AMA-1 após diferenciação das células dendríticas na presença do antígeno recombinante,  $1 \times 10^5$  células dendríticas diferenciadas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-Pv-AMA-1 na diluição 1:100 por 2 horas a temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS e marcadas com anticorpo monoclonal anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (BD Pharmingen, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Os dados sobre as células marcadas foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, USA), selecionando-se as populações de linfócitos. Cinquenta mil eventos foram adquiridos e analisados pelo software CellQuest (BD Biosciences, EUA).

#### **4.8. Determinação da produção de citocinas e quimiocinas por ELISA de captura**

As citocinas (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-12p40) foram detectadas e quantificadas nos sobrenadantes de cultura utilizando-se kits comerciais (R&D Systems, EUA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para detecção do ensaio foram utilizados anticorpos de detecção biotinizados combinados com estreptavidina-HRP (Amersham Biosciences, EUA) e o cromógeno OPD (Sigma). A reação colorimétrica foi analisada em um leitor de microplacas de ELISA (492 nm). O cálculo das concentrações finais de citocinas e quimiocinas a partir dos valores médios de densidade óptica foi obtido pela interpolação de uma curva padrão utilizando-se o software SOFTmax<sup>®</sup> Pro 4.8. Resultados foram obtidos em pg/mL.

#### **4.9. Determinação do perfil de células reguladoras e avaliação funcional após estímulo de PBMCs com antígeno recombinante de *P. vivax***

PBMCs de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* foram incubadas com 10  $\mu$ g/mL de Brefeldin A (Sigma, USA) por 4 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação, as células foram marcadas com anticorpos específicos para CD4 (clone SK3), e CD25 (clone M-A251), por 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz. As células foram então fixadas em formaldeído (4% em PBS) e permeabilizadas em PBS contendo 0,5% de saponina (Sigma, USA) por 20 minutos. Finalmente, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais reativos a FoxP3 (clone 236A), CTLA-4 (clone BNI3), GITR (clone eBioAITR), IL-10 (clone JES3-9D7), TGF- $\beta$  (clone TB21), IFN- $\gamma$  (clone 4S.B3) e IL-17 (clone 64CAP17). Os dados sobre as células marcadas foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, USA), selecionando-se as populações de linfócitos. Cinquenta mil eventos foram adquiridos e analisados pelo software CellQuest (BD Biosciences, EUA). Controles isotípicos marcados com FITC, PE, PE-Cy5 e APC foram usados em todos os experimentos.

Para a avaliação funcional, linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foram isolados com auxílio da técnica de MACS (magnetic cell sorting). Em resumo, a população de interesse foi magneticamente marcada com microesferas anti-CD4 e anti-CD25. Em seguida, a suspensão celular foi submetida a um campo magnético de um separador MACS (QuadroMACS®, Miltenyi Biotec, EUA). Células não marcadas passaram pela coluna, na presença de campo magnético, e foram utilizadas como culturas depletadas. Após remoção da coluna do campo magnético, as células magneticamente retidas (98% de pureza) foram eluídas em tampão (PBS pH 7,2 com 0,5% BSA e 2 mM EDTA), lavadas (PBS) e contadas em câmara de Neubauer. Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, nas concentrações 1:2, 1:5 e 1:10, foram co-incubadas com 5x10<sup>6</sup> PBMCs autólogos previamente marcadas com 0,4 µM de CFDA-SE, em ambiente 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 5 dias. Para avaliação da proliferação celular foi utilizada a razão da proliferação observada nas culturas de PBMCs estimuladas com antígeno AMA-1 na presença de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sobre os valores determinados em culturas de PBMC estimuladas com AMA-1 somente (sem células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, EUA).

#### **4.10. Determinação do perfil de células Th17 em PBMCs**

Células Th17 foram caracterizadas pela expressão da citocina IL-17 em linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*. A marcação intracelular foi realizada conforme previamente descrito para fenotipagem de células T reguladoras. Os dados sobre as células marcadas foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, USA), selecionando-se as populações de linfócitos. Cinquenta mil eventos foram adquiridos e analisados pelo software CellQuest (BD Biosciences, EUA).

#### **4.11. Predição de epítomos de células B na proteína Pv-AMA-1**

A predição de epítomos de células B foi realizada utilizando-se o programa *BepiPred* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>). Este software requer a entrada de sequências únicas no formato FASTA e prediz epítomos potenciais de células B. Os escores de predição são calculados baseados nos perfis HMM de antígenos conhecidos, além de métodos de propensão de escalas baseados na hidrofiliidade e predição de estrutura secundária. Como sugerido pelos autores do software, valores acima de 0,35 são considerados com o potenciais epítomos de células B.

A predição de regiões intrinsecamente desestruturadas/desordenadas (intrinsically unstructured/disordered regions – IURs) foi realizada utilizando-se o programa *IUpred* (<http://iupred.enzim.hu/>). Este software também requer a entrada de sequências únicas no formato FASTA e prediz potenciais regiões IURs que ocorrem na sequência analisada. IURs não possuem interações inter-residuais suficientes (interações hidrofóbicas em sua maioria) para estabilizar a energia necessária para evitar a perda de entropia durante o dobramento. Portanto, os escores de predição são calculados utilizando-se uma análise de vizinhança com a variação entre 2-100 aminoácidos e, para cada análise de polipeptídeos, foi calculado o potencial de formação de interações estabilizantes. O resultado final é determinado pelo escore individual para cada aminoácido, que varia de 0 (completamente ordenado) a 1 (completamente desordenado). IURs foram então preditas como regiões com pelo menos 9 aminoácidos contíguos com escore de predição *iupred* individual para cada aminoácido acima de 0,35.

#### **4.12. Síntese de peptídeos em fase sólida**

Os peptídeos selecionados foram sintetizados utilizando-se um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida que utiliza aminoácidos especiais para síntese *in vitro*. Estes aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil metil oxicarbonila) e foram acoplados à fase sólida, que também está protegida (resina). O protocolo foi realizado de acordo com Gausepohl (1992), com

algumas modificações: A resina (Rink Amide) foi colocada dentro de um tubo de síntese e o seu grupamento Fmoc foi liberado, cobrindo-a com 2mL de piperidina 20% em DMF (Dimetilformamida). A resina foi lavada por 12 minutos com esta solução, e todas as lavagens foram feitas com auxílio de uma bomba a vácuo. O tubo de reação foi lavado três vezes com 2mL de DMF por lavagem. O acoplamento dos aminoácidos Fmoc foi iniciado com a ligação do grupamento carboxila do primeiro aminoácido ao grupamento amina da resina, formando uma ligação peptídica.

O primeiro aminoácido foi colocado no tubo de síntese com HOBt (hidroxibenzotriazol) e DIPC (diisopropilcabodiimida), que permitem a ativação da função COOH dos aminoácidos Fmoc. Foi adicionado volume de DMF suficiente para cobrir toda a resina, sendo o tubo incubado a temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Após incubação, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado com auxílio de bomba a vácuo, e a resina lavada com DMF por 3 vezes. A ligação dos aminoácidos conseguintes foi realizada conforme os passos anteriormente descritos. Após o término do último ciclo, o último aminoácido foi desprotegido exatamente como os anteriores, e a resina lavada 4 vezes por 5 minutos com dicloroetano. O peptídeo foi desligado da resina pelo uso de uma solução de clivagem contendo 2,5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, diluída em água em um volume final de 5mL de TFA (ácido trifluoroacético). A solução com cada peptídeo foi colhida com o auxílio de uma bomba a vácuo, e estes precipitados com éter gelado overnight a 4<sup>o</sup>C. Cada solução foi centrifugada a 3000rpm por 30 minutos, o sobrenadante desprezado e o peptídeo ressuspendido em água destilada. Após a obtenção dos peptídeos, estes foram liofilizados, purificados em HPLC e analisados em espectrômetro de massa para confirmação da massa molecular. Após a produção e confirmação das massas moleculares, o peptídeo específico foi testado em ensaios de ELISA frente aos soros dos indivíduos infectados com *P. vivax* e frente aos soros dos indivíduos controle.

#### **4.13. Análise estatística**

O teste Kolmogorov-Smirnov foi inicialmente utilizado para determinar a normalidade dos dados. Para variáveis com distribuição gaussiana, o teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar médias de grupos independentes, seguido pelo teste t de comparação múltipla de Dunnet, utilizado para comparar culturas estimuladas com antígenos em relação à cultura controle. As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi igual ou menor que 0,05; todos os valores de P refletem uma análise bimodal. Para as análises univariadas foi utilizado o teste estatístico Prism for Windows 5.0 (GraphPad, Inc).

## 5. RESULTADOS

Os resultados encontram-se descritos em artigos publicados e submetidos a publicação em revistas indexadas, os quais serão apresentados conforme abaixo:

1- **Bueno, L. L.**, Morais, C. G., Soares, I. S., Bouillet, L. E., Bruna-Romero, O., Fontes, C. J., Fujiwara, R. T., Braga, E. M. *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. **Vaccine** 27:5581-5588, 2009.

2- **Bueno, L. L.**, Morais, C. G., Araujo, F. F., Gomes, J. A., Correa-Oliveira, R., Soares, I. S., Lacerda, M. V., Fujiwara, R. T., Braga, E. M. *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. **PLoS One** 5:e9623, 2010.

3- **Bueno, L. L.**, Morais, C. G Lacerda, M. V., Fujiwara, R. T., Braga, E. M. Interleukin-17 producing T helper cells (Th17) are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. **Submetido**

4- **Bueno, L. L.**, Lobo, F. P., Morais, C. G., Mourão, L. P., Ávila, R. A. M., Soares, I. S., Fontes, C. J., Lacerda, M. V., Olórtegui, C. C., Bartholomeu, D. C., Fujiwara, R. T., Braga, E. M. Mapping of a highly immunogenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). **Submetido a PLoS One.**



## *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells

Lilian Lacerda Bueno<sup>a</sup>, Cristiane Guimarães Morais<sup>a</sup>, Irene da Silva Soares<sup>b</sup>,  
Leoneide Erica Maduro Bouillet<sup>c</sup>, Oscar Bruna-Romero<sup>c</sup>, Cor Jesus Fontes<sup>d</sup>,  
Ricardo Toshio Fujiwara<sup>a,e</sup>, Érika Martins Braga<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 May 2009

Received in revised form 6 July 2009

Accepted 14 July 2009

Available online 3 August 2009

#### Keywords:

*Plasmodium vivax*

AMA-1

Dendritic cells

Pro-inflammatory response

Recombinant protein

Modulation

### ABSTRACT

The Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) is a well-characterized and functionally important merozoite protein and is currently considered a major candidate antigen for a malaria vaccine. Previously, we showed that AMA-1 has an influence on cellular immune responses of malaria-naïve subjects, resulting in an alternative activation of monocyte-derived dendritic cells and induction of a pro-inflammatory response by stimulated PBMCs. Although there is evidence, from human and animal malaria model systems that cell-mediated immunity may contribute to both protection and pathogenesis, the knowledge on cellular immune responses in vivax malaria and the factors that may regulate this immunity are poorly understood. In the current work, we describe the maturation of monocyte-derived dendritic cells of *P. vivax* naturally infected individuals and the effect of *P. vivax* vaccine candidate Pv-AMA-1 on the immune responses of the same donors. We show that malaria-infected subjects present modulation of DC maturation, demonstrated by a significant decrease in expression of antigen-presenting molecules (CD1a, HLA-ABC and HLA-DR), accessory molecules (CD40, CD80 and CD86) and FcγRI (CD64) receptor ( $P \leq 0.05$ ). Furthermore, Pv-AMA-1 elicits an upregulation of CD1a and HLA-DR molecules on the surface of monocyte-derived dendritic cells ( $P=0.0356$  and  $P=0.0196$ , respectively), and it is presented by AMA-1-stimulated DCs. A significant pro-inflammatory response elicited by Pv-AMA-1-pulsed PBMCs is also demonstrated, as determined by significant production of TNF- $\alpha$ , IL-12p40 and IFN- $\gamma$  ( $P \leq 0.05$ ). Our results suggest that Pv-AMA-1 may partially revert DC down-modulation observed in infected subjects, and exert an important role in the initiation of pro-inflammatory immunity that might contribute substantially to protection.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Malaria is present in nearly 90 countries with approximately 2.5 billion people exposed to infection by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* [1]. *P. vivax* is the major cause of malaria outside Africa, mainly afflicting Asia and the Americas [2]. While deaths are rare compared to the incidence of *P. falciparum* mortality, there is an increasing number of publications reporting severe disease, including respiratory distress and coma as a result of *P. vivax* infection [3,4]. This disease affects poor people living in developing economies, leading their children to life-long learning impairment, while also incapacitates adults, having tremendous direct economic

consequences through loss of productivity and a depletion of meager financial reserves [5]. The most cost-effective measure to control infectious diseases like malaria is a vaccine but effective malaria vaccines are still not available [6].

Several asexual blood-stage antigens have been identified as potential vaccine candidates, and studies in malaria endemic areas have shown their immune recognition by exposed individuals [1,7–9]. The Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) is a well-characterized and functionally important merozoite protein and is currently considered a major candidate antigen for a malaria vaccine [10]. AMA-1 is synthesized in the late asexual schizont stage of the *Plasmodium* parasite and accumulates in the micronemes of developing merozoites. Just prior to red blood cell (RBC) invasion, the mature form of the protein is transported to the merozoite surface membrane as an 83 kDa protein in *P. falciparum* or as a 66 kDa in the other malaria species [11].

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 34992841; fax: +55 31 34992970.  
E-mail address: [embraga@icb.ufmg.br](mailto:embraga@icb.ufmg.br) (É.M. Braga).



Malaria vaccine development has focused on identification of target antigens of protective immunity rather than on the nature of anti-malarial immune effector mechanisms. Many studies indicate that protection against blood-stage malaria is dependent on both humoral and cell-mediated mechanisms [12–14]. Several mechanisms of protective humoral response have been described and include blockade of invasion of RBCs by merozoites [15], antibody-dependent cellular killing mediated by cytophilic antibodies [16] and binding of antibodies to parasite-induced molecules on the RBCs surface, leading to clearance of infected cells [17]. Protective cellular immune responses against malaria can be initiated by antigen-presenting cells (e.g. dendritic cells) that ultimately activate specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, promoting development of protective Th1-dependent immune responses to blood-stage malaria infection [18] mediated by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [19]. These cytokines act synergistically to optimize nitric oxide production [20], which may be involved in parasite killing [21]. Several studies have described that contact of parasitized RBCs or crude parasite extracts with dendritic cells (DCs) induces their unique ability to prime naïve lymphocytes and stimulate the production of pro-inflammatory cytokines [18,22,23]. In contrast, other authors report that the same parasitized erythrocytes as well as parasites products may selectively impair DC maturation, resulting in an alternative activation status of these dendritic cells [24–28]. While the effect of malaria on DC function has not been completely understood yet, it is essential to elucidate it due to its impact on vaccination in endemic areas [29].

In the current work, we describe the maturation of monocyte-derived dendritic cells of *P. vivax* naturally infected subjects resident in Brazilian endemic areas and the effect of *P. vivax* vaccine candidate Pv-AMA-1 on the immune responses of the same donors. Here we show, that while malaria-infected subjects present a down-modulation of DC maturation, Pv-AMA-1 elicits an upregulation of antigen-presenting molecules on the surface of monocyte-derived dendritic cells, and it is presented by AMA-1-stimulated DCs. Finally, we further demonstrate a significant pro-inflammatory response elicited by Pv-AMA-1-pulsed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Our results suggest that Pv-AMA-1 may partially revert DC modulation observed in malaria-infected subjects and exert an important role in the initiation of pro-inflammatory immune responses that might contribute substantially to the parasitaemia control.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population and blood samples

This study concerned 30 patients with *P. vivax* malaria who were living in Cuiabá, the capital of Mato Grosso state, north-western Brazil, where active malaria transmission does not occur. All patients reported previous visits to regions of six Brazilian states where malaria is endemic, i.e., Acre, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia and Roraima. The patients were unrelated, as there were no family clusters, and they were attended and diagnosed at the Hospital Julio Muller of the Universidade Federal de Mato Grosso. Twenty healthy adult blood donors were recruited for the study over the course of several months from Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, a non-endemic area for malaria. The study was approved by the Ethical Committee on Research of Universidade Federal de Minas Gerais (Protocol #ETIC 060/07) and Universidade Federal do Mato Grosso (Protocol #325/CEP-HUJM/07). Blood was obtained after receiving the inform consent.

Venous blood was collected in EDTA and heparin-containing tubes (4 and 32 mL, respectively) and was used to prepare thick smears for microscopy, to extract parasite DNA and PBMC isolation. Parasitological evaluation was performed by examination of 200

**Table 1**

Description of the study population by age and hematological parameters (mean  $\pm$  SD).

	Individuals	
	Malaria-infected <sup>a</sup> (n = 30)	Malaria-naïve (n = 20)
Age mean (years)	37.6 $\pm$ 12.63	36.43 $\pm$ 11.96
Hemoglobin (g/dL)	12.81 $\pm$ 1.59*	16.03 $\pm$ 1.15
Hematocrit (%)	37.8 $\pm$ 4.2*	47.4 $\pm$ 3.1
Platelets (cells/mm <sup>3</sup> )	138,301 $\pm$ 51,964*	187,500 $\pm$ 23,166

<sup>a</sup> *P. vivax* infection detected by parasitological smears and PCR.

\* Statistically different from control group ( $P < 0.05$ )

fields at 1000 $\times$  magnification under oil-immersion. All slides were examined by three well-trained microscopists from the Brazilian Ministry of Health. The *P. vivax* mono-infection was confirmed by PCR as previously described [30]. Hemoglobin, hematocrit (HCT) and platelet levels were measured using a blood cell counter (ABX Pentra 90; Horiba Diagnostics, Kyoto, Japan) (Table 1).

### 2.2. Recombinant Pv-AMA-1

The recombinant protein representing amino acids 43–487 of Pv-AMA-1 [31,32] was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) at 37 $^{\circ}$ C for 3 h by adding 0.1 mM isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG, Invitrogen), as previously described [28]. Briefly, bacterial cell lysates containing Pv-AMA-1 were centrifuged at 10,000  $\times$  g for 30 min at 4 $^{\circ}$ C and the pellet containing the inclusion bodies was solubilized under continuous agitation in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol containing 8 M urea, at 37 $^{\circ}$ C for 2 h. After centrifugation at 10,000  $\times$  g for 30 min, the supernatant was subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE. Gels were stained with a solution of 250 mM KCl, and the band corresponding to the recombinant protein was isolated. The Pv-AMA-1 protein was eluted by incubation of the gel slice in ddH<sub>2</sub>O at room temperature under constant agitation for 18 h. The eluted protein was concentrated using a Speed-Vac SC 110 (Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA). The proteins were dialyzed against PBS at 4 $^{\circ}$ C for 48 h and quantitated by SDS-PAGE using bovine serum albumin as standard.

The Pv-AMA-1 antigen was tested to determine the presence of Gram-negative bacterial endotoxin using a chromogenic Limulus Amebocyte Lysate test (QCL-1000, Cambrex, USA) according to the manufacturer's instruction, and was found to be a non-significant source of endotoxins (levels lower than detection limit of 5 EU/mL).

### 2.3. Polyclonal antibody against Pv-AMA-1

The polyclonal mice serum was obtained by immunization of BALB/c mice with *E. coli*-derived recombinant Pv-AMA-1 in Freund's adjuvant. Animals were immunized with 50  $\mu$ g of Pv-AMA-1 diluted in saline solution and emulsified 1:1 in Freund's complete adjuvant (Sigma Aldrich Co., USA) for the first immunization and Freund's incomplete adjuvant for following immunizations. Immunizations were done three times with a 3 weeks interval between immunizations. Fifteen days after last immunization, sera were collected. Control mice were immunized with the same volume of adjuvant in 1 $\times$  PBS.

### 2.4. Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained as previously described [28]. Briefly, cells were isolated from heparinized blood on a density gradient centrifugation (Histopaque<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich Co., USA) and were resuspended at final concentration of 1  $\times$  10<sup>7</sup> cell/mL in RPMI 1640 medium (Invit-

rogen Co., USA) supplemented with 2 mM of L-glutamine (Sigma), 5% heat-inactivated human AB serum (Sigma) and 6% Antibiotic–Antimycotic solution (Invitrogen).

### 2.5. Monocyte purification, generation and maturation of human dendritic cells *in vitro*

Monocytes were sorted from isolated PBMCs using anti-CD14-labelled magnetic beads (CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotech Inc., USA) according to the manufacturer's instructions and were cultured in complete RPMI 1640 medium. Recombinant IL-4 and GM-CSF (both from PeproTech, USA) were added to the culture at 50 ng/mL on days 1, 3 and 5 of culture to induce fully differentiation of monocytes into dendritic cells. For DC maturation, cells were stimulated with 10 µg/mL of *Salmonella* lipopolysaccharide (LPS, Sigma) for 48 h. Matured DC were harvested at day 7 of culture, washed twice with PBS and used for flow cytometric analysis.

### 2.6. Flow cytometry analysis of dendritic cells

Matured dendritic cells were stained using monoclonal antibodies to determine the expression of cell presentation molecules (HLA-DR, HLA-ABC and CD1a), costimulatory molecules (CD86, CD80 and CD40), immunoglobulin receptors (CD64/FcγRI and CD16/FcγRIII) and other monocyte markers (CD11c and CD14). The relative expression of CD11c was used to discriminate maturation of monocyte-derived dendritic cells. The following monoclonal antibodies were used: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human CD80, CD64 and CD16, phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human HLA-ABC, CD86, CD40, CD11c and CD14, PE-Cy5-conjugated mouse anti-human CD1a and HLA-DR (all from BD Pharmingen, USA).

Dendritic cells were harvested, washed in PBS and then stained using the antibodies described above at room temperature for 20 min. Stained cells were analyzed using a FACScan® cytometer (Beckton Dickinson, USA) and CellQuest® software (Beckton Dickinson). Mean fluorescence intensity was evaluated by analysis of histograms generated by 30,000 viable cells, and determined by CellQuest® software (Beckton Dickinson).

### 2.7. Detection of Pv-AMA-1 peptides on monocyte-derived dendritic cells surface after differentiation and maturation

Monocyte-derived dendritic cells from infected subjects were obtained by differentiation and maturation in the presence of 1 µg/well of Pv-AMA-1 as previously described [28].  $1 \times 10^5$  Pv-AMA-1-pulsed dendritic cells were incubated with polyclonal anti-Pv-AMA-1 antibody at 1:100 dilution in PBS for 2 h at room temperature. Cells were thoroughly washed three times in PBS and then stained using a FITC-conjugated monoclonal antibody anti-mouse IgG (BD Pharmingen, USA) at room temperature for 30 min. Stained cells were washed and analyzed using a FACScan® cytometer (Beckton Dickinson, USA) and CellQuest® software (Beckton Dickinson). Frequency of Pv-AMA-1<sup>+</sup> dendritic cells and mean fluorescence intensity were evaluated from 30,000 viable cells. Monocyte-derived dendritic cells from same donors, differentiated in the absence of Pv-AMA-1, were used as control.

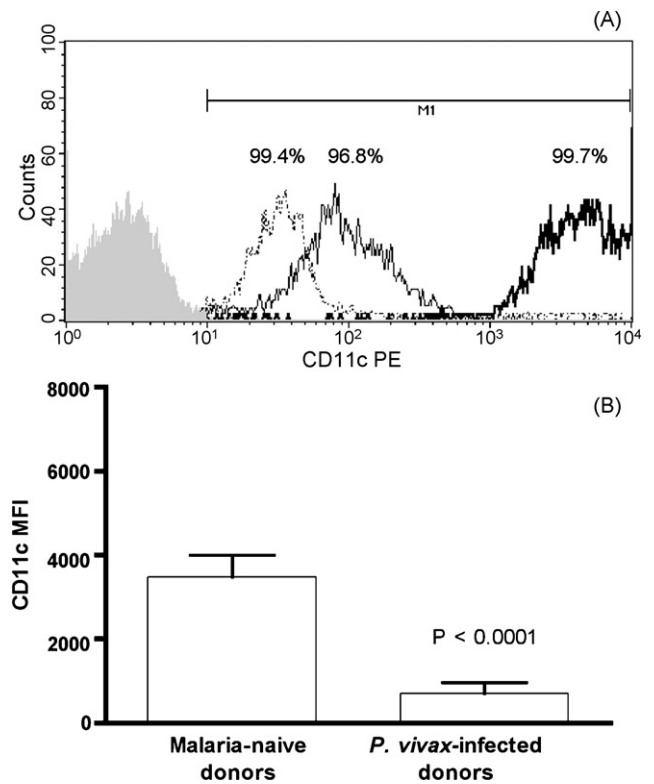
### 2.8. PBMC cultures

Cells ( $5 \times 10^5$  PBMCs) were aliquoted into 48-well flat bottom tissue culture plates (Corning, USA) and incubated with Pv-AMA-1 at antigen concentration of 1 µg/well, as previously described [28]. Cells were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 1, 2, 4 and 6 days. Additional culture with 1 µg/mL of PMA mitogen

(Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma) was performed as positive control. For determination of cytokine production, supernatants were collected after appropriate incubation period from each well and stored at –80 °C until required for the assay.

### 2.9. Determination of chemokine/cytokine production by sandwich ELISA

The cytokine IL-12p40, IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-4 and TGF-β were detected and quantified in cell supernatants by commercially available sandwich ELISA kits (R&D Systems, USA). Assays were performed according to the manufacturer's instructions. Biotin-labelled detection antibodies were used, revealed with streptavidin-HRP (Amersham Biosciences, USA) and OPD substrate system (Sigma). The colorimetric reaction was read in an automated ELISA microplate reader at 492 nm. Calculations of chemokine/cytokine concentrations from mean optical density values were interpolated from the standard curve using 4-parameter curve fitting software (SOFTmax® Pro 5.2). Results were achieved in pg/mL and the detection limits were as follows: 23.4 pg/mL for IL-10; 15.6 pg/mL for IL-4 and TGF-β; 7.8 pg/mL for IL-12p40, IFN-γ and TNF-α 3.9 pg/mL. Samples with values above the top of the standard curve were retested at 1/10 or 1/100 dilutions in RPMI 1640, and the chemokine/cytokine levels were recalculated.



**Fig. 1.** Reduction of dendritic cells differentiation determined by flow cytometric analysis of monocyte-derived dendritic cells. (A) Cell surface expression of CD11c on monocytes (dotted line), LPS-matured DCs from malaria-naïve (thick line) and *P. vivax*-infected donors (thin line); control cells (stained with isotype antibodies only, gray shadow) were used to determine negative population. Percentage of CD11c<sup>+</sup> cells is indicated above respective cell population. Representative data from one individual is shown. (B) Cell surface expression of CD11c on LPS-matured DCs from malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors. Mean intensity of fluorescence (MFI) ± standard error of cell surface expression of CD11c ( $n=20$  and  $30$ , respectively). Mean intensity of fluorescence is indicated on Y-axis (mean ± SEM). Statistical difference is indicated above the graph bar.

### 2.10. Statistical analysis

The one-sample Kolmogorov–Smirnov test was used to determine whether variable was normally distributed. Student's *t*-test was used to determine the differences ( $P < 0.05$ ) between malaria-infected and control groups, when variables were normally distributed. All statistics were performed using Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.).

## 3. Results

### 3.1. Alterations on surface cell molecules expression of monocyte-derived dendritic cells from naturally *P. vivax*-infected individuals

Prior to the assessment of the effect of Pv-AMA-1 on in vitro differentiation of dendritic cells, and given the numerous published reports indicating modulation of monocyte and DC function by malarial products [25,26,28,33], alterations on cell surface molecule expression of monocyte-derived dendritic cells was first determined in the natural infection of *P. vivax*. Flow cytometric analyses showed an overall down-regulation of almost all cell surface markers evaluated. Our results revealed that although expression of CD11c<sup>+</sup> cells was similar on monocytes, and DCs from both infected and malaria-naïve individuals (Fig. 1A), a significant decrease of surface expression of integrin CD11c was observed in DCs from naturally infected individuals presented when com-

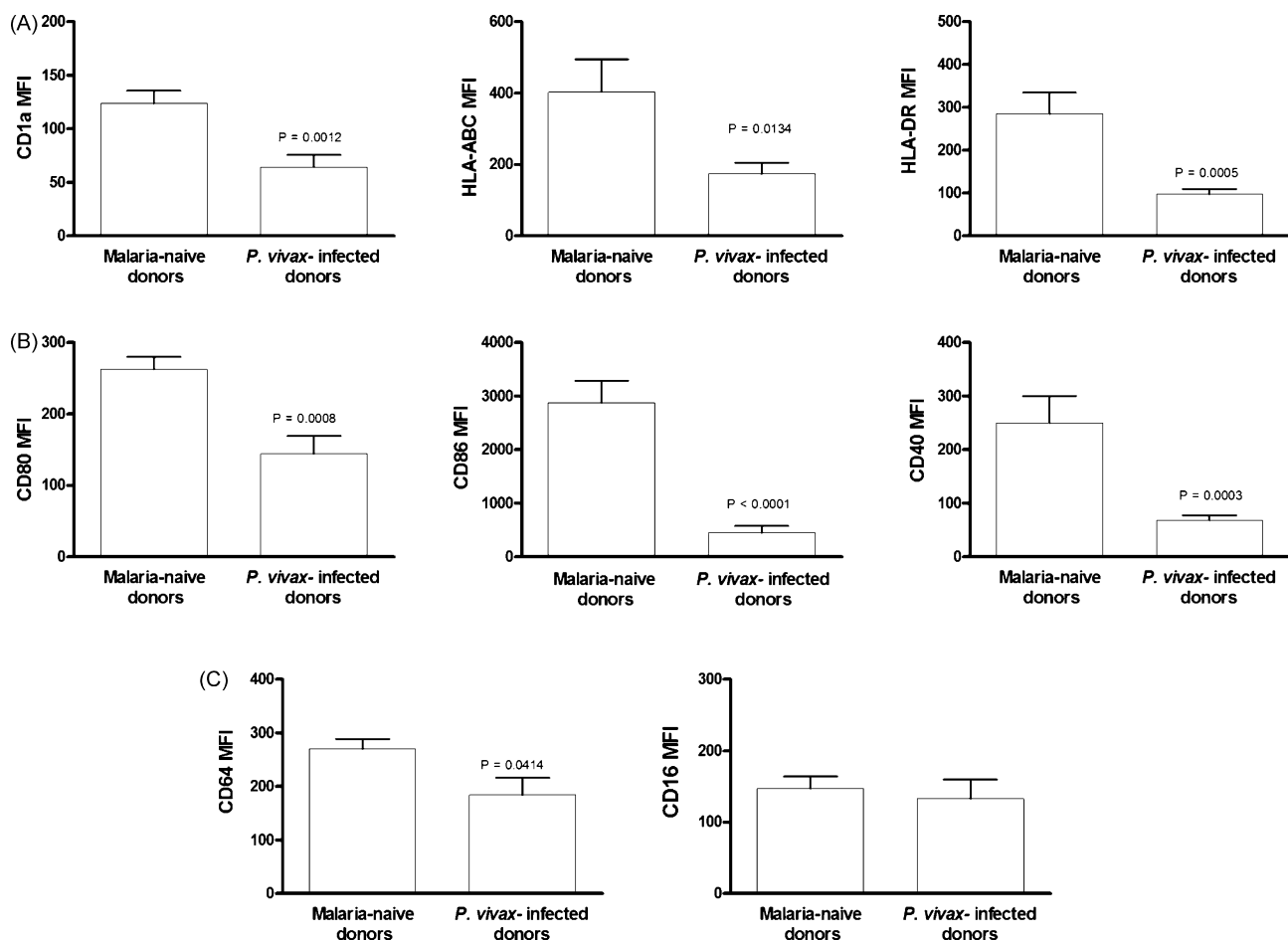
pared to healthy non-exposed (malaria-naïve) controls ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 1B). Furthermore, expression of antigen-presenting molecules (CD1a, HLA-ABC and HLA-DR), accessory molecules (CD80, CD86 and CD40), and immunoglobulin receptor CD64/FcγRI were significantly down-modulated in infected individuals when compared to control donors ( $P < 0.05$  for all, Fig. 2A, B and C, respectively). No significant difference on expression of CD16/FcγRIII was observed.

### 3.2. Pv-AMA-1 partially restores the modulation of monocyte-derived dendritic cells of naturally *P. vivax*-infected individuals

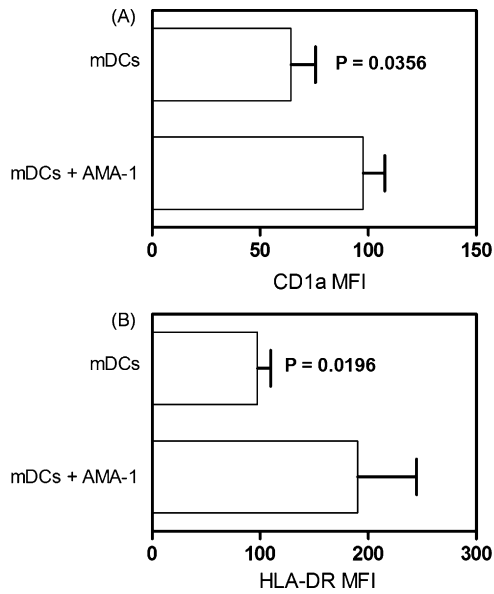
Monocytes from infected donors were differentiated into DCs in the presence or absence of Pv-AMA-1 and cell surface molecule expression was assessed by flow cytometry. FACS analyses showed that Pv-AMA-1 elicits a significant increased expression of antigen-presenting molecules CD1a and HLA-DR ( $P = 0.0356$  and  $P = 0.0196$ , respectively) (Fig. 3A and B, respectively), reaching levels close to those presented by malaria-naïve individuals.

### 3.3. Pv-AMA-1 peptides are presented by monocyte-derived dendritic cells from naturally *P. vivax*-infected individuals after exposure to the recombinant antigen

Once we determined that Pv-AMA-1 influences dendritic cell differentiation in infected individuals, potentially increasing its ability to antigen presentation, we further demonstrated whether



**Fig. 2.** Flow cytometric analysis of monocyte-derived dendritic cell surface markers. Cell surface expression on LPS-matured DCs from malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors ( $n = 20$  and  $30$ , respectively). (A) Cell surface expression of antigen-presenting molecules (CD1a, HLA-ABC and HLA-DR). (B) Cell surface expression of accessory molecules (CD80, CD86 and CD40). (C) Cell surface expression of immunoglobulin receptor (CD64/FcγRI and CD16/FcγRIII). Mean intensity of fluorescence is indicated on Y-axis (mean  $\pm$  SEM). Statistical differences are indicated on the graphs with significant *P* values.

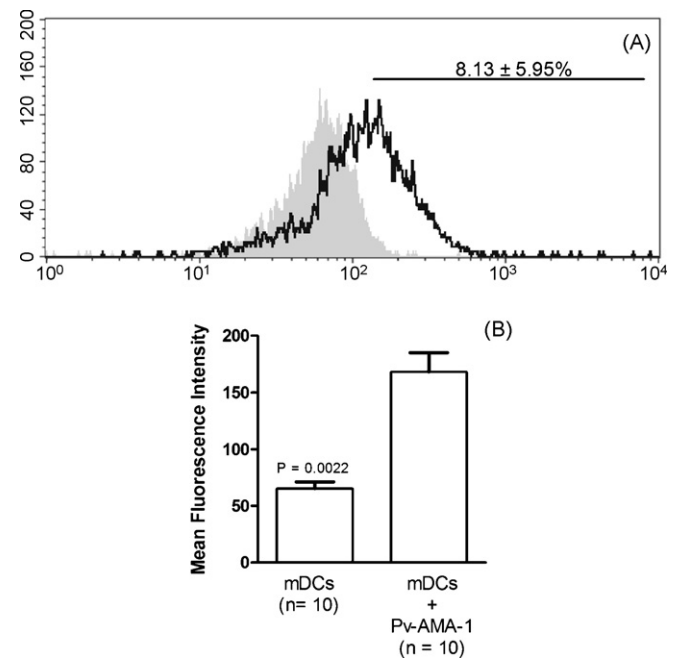


**Fig. 3.** Pv-AMA-1 partially restores the antigen-presenting molecules expression on monocyte-derived dendritic cells from *P. vivax*-infected individuals ( $n = 30$ ). (A) Cell surface expression of CD1a in LPS-matured DCs (mDCs) and LPS-matured DCs cultivated with Pv-AMA-1 (mDCs+AMA-1). (B) Cell surface expression of HLA-DR in LPS-matured DCs (mDCs) and LPS-matured DCs cultivated with Pv-AMA-1 (mDCs+AMA-1). Mean intensity of fluorescence is indicated on X-axis (Mean  $\pm$  SEM). Statistical differences are indicated on the graphs with significant *P* values.

Pv-AMA-1 peptides were effectively presented by dendritic cells after antigen processing. Monocytes from infected donors were again differentiated into DCs in the presence or absence of Pv-AMA-1, and the detection of the recombinant antigen was performed by flow cytometry. The frequency of monocyte-derived dendritic cells differentiated with Pv-AMA-1 that presented antigen-related peptides on the surface was only  $8.13 \pm 5.9\%$  ( $n = 10$ ) (Fig. 4A), when compared to control cells. On the other hand, cells differentiated in the presence of Pv-AMA-1 presented a significantly augmented expression of Pv-AMA-1 peptides on surface ( $P = 0.0022$ , Fig. 4B).

### 3.4. Cytokine production after Pv-AMA-1 stimulation

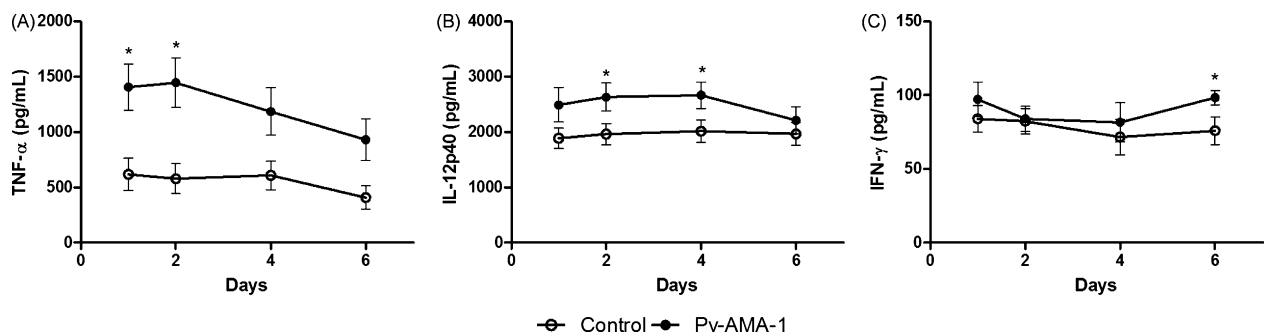
Given the previous report that Pv-AMA-1 acts on innate immune response inducing cytokine production [28] and, due to its influence in the adaptive immune response, we assessed the effect of Pv-AMA-1 on cytokine production in naturally infected individ-



**Fig. 4.** Pv-AMA-1 peptides are recognized on surface of monocyte-derived dendritic cells from *P. vivax*-infected individuals after differentiation in the presence of the recombinant antigen. (A) Cell surface expression of Pv-AMA-1 subproducts on LPS-matured DCs (gray shadow) and LPS-matured DCs cultivated with Pv-AMA-1 (black line). The value indicated on the graph represents the frequency of Pv-AMA-1<sup>+</sup> dendritic cells (mean  $\pm$  SD) comparing to baseline (LPS-matured DCs only) ( $n = 10$ ). Mean intensity of fluorescence is indicated on X-axis. (B) Mean fluorescence intensity of Pv-AMA-1 expression on LPS-matured DCs (mDCs) and LPS-matured DCs cultivated with Pv-AMA-1 (mDCs + AMA-1) ( $n = 10$ ). Statistical differences are indicated on the graph with significant *P* value.

uals. Supernatants from antigen stimulated PBMC cultures were evaluated by sandwich ELISA. Production of cytokines from DC supernatants was not assessed due the possible interference of exogenous IL-4, which was used in the differentiation process.

Stimulation of PBMCs with recombinant Pv-AMA-1 did not induce any IL-4 and TGF- $\beta$  production (data not shown). TNF- $\alpha$  production was increased in cultures with Pv-AMA-1 in all experimental times in comparison to non-stimulated cultures. Statistically significant differences on TNF- $\alpha$  production were observed after 24 and 48 h of culture ( $P = 0.0115$  and  $P = 0.0051$ , respectively, Fig. 5A). Moreover, Pv-AMA-1-stimulated cells secreted a significantly higher level of IL-12p40, mainly at days 2 and 4, when compared to controls ( $P = 0.0368$  and  $P = 0.0417$ , respectively, Fig. 5B). Finally, significant production of IFN- $\gamma$  was only verified in antigen-pulsed cells at day 6, when compared to cytokine level observed in unstimulated cul-



**Fig. 5.** Kinetics of cytokine production from PBMCs of *P. vivax*-infected donors with (closed circle) or without (open circle) exposure to Pv-AMA-1, for up to 6 days. Detection of (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-12p40 and (C) IFN- $\gamma$ . Results are expressed in mean of cytokine production (pg/mL)  $\pm$  SEM ( $n = 30$ ). Statistical differences between stimulated and unstimulated cultures ( $P \leq 0.05$ ) are indicated with an asterisk (\*).

tures ( $P=0.0415$ , Fig. 5C). Interestingly, no production of IL-10 was detected after stimulation (data not shown).

#### 4. Discussion

During the last two decades, with the cloning of the malaria antigens, the development of subunit malaria vaccine candidates has been pursued [34,35]. Several clinical trials have been carried out, however no vaccine yet has provided a strong and lasting immune response [36]. Although malaria vaccine development has been limited due to immunological hurdles described for subunit vaccines [6], numerous candidates have been described and are currently being tested in pre-clinical and clinical trials [1,36,37]. Among them, the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1), a merozoite protein that appears to be essential during invasion of host cells, is a leading blood-stage vaccine candidate.

Current understanding of AMA-1 immunity suggests that direct action of antibodies is the primary protective mechanism, although a role for other immune effectors cannot be ruled out [10]. Indeed, in a previous report, we showed that AMA-1 exerts an influence on cellular immune responses of malaria-naïve subjects, resulting in an alternative activation of monocyte-derived dendritic cells and induction of pro-inflammatory responses by stimulated PBMCs [28]. Although there is consistent evidence from human and animal malaria model systems that cell-mediated immunity may contribute to both protection and pathogenesis [13,38], the knowledge on cellular immune responses in vivax malaria and the factors that may regulate this immunity are poorly understood.

Dendritic cells have an essential role in linking innate and adaptive immune responses by providing antigenic stimulation for T and B cells [39]. Controversial studies have provided data to suggest that, in human and rodent malaria, DC function can be modulated by parasitized erythrocytes, including inhibition of DC differentiation, thereby preventing T cell activation [18,22–24,26,29,33,39,40]. In current study, we used an in vitro model of monocyte-derived DCs, originally demonstrated by Sallusto and Lanzavecchia [41], which has prompted numerous studies on human DCs that were previously hampered by the difficulties in working with ex vivo-isolated human DCs. This technique has proven to be an extremely powerful tool for the study of human DC differentiation and maturation processes [42]. We showed that naturally infected individuals present an impairment of DC differentiation and overall down-modulation of antigen-presenting molecules (CD1a, HLA-ABC and HLA-DR), accessory molecules (CD80, CD86 and CD40) and FcγRI immunoglobulin receptor (CD64), which resembles the effect of parasitized erythrocytes [24–26,43] and hemozoin [27,44] on DC modulation. Different than described for *P. falciparum* infection where in vitro cultivation of the parasite is established, any conclusion on the precise factor that could render the suppression of DC differentiation on *P. vivax* infection is difficult to ascertain. However, the role of parasitized erythrocytes could not be ruled out and deserve further elucidation. Moreover, overstimulation of DCs via Toll-like receptors as a result of an exponential increase in parasite load [45] may also occur in *P. vivax* infection. Nonetheless, inhibition of DC maturation or alteration of its function may account for the suppression observed in malaria infection [39], described as low cellular in vitro reactivity among subjects with long-term exposure to malaria transmission [46]. Although this inhibition of monocyte-derived DCs maturation may not necessarily reproduce the real effect of malarial infection on DCs, it might partially explain the decreasing numbers of DC (both plasmacytoid and myeloid cells) reported among individuals with acute *P. vivax* [47] and severe *P. falciparum* [48] infections. From a vaccine perspective, the implications of having naturally exposed individuals resident in endemic areas of malaria that may present modulation

of professional antigen-presenting cells such as DCs are critical. If DCs are compromised during malaria, then vaccination of infected individuals may not be successful [33]. Therefore, it is essential to understand the effect of the parasite on DC function in the initiation of immune responses, as this impacts on vaccination in endemic areas [29].

While impairment of monocyte-derived dendritic cell differentiation is observed in *P. vivax* infected donors, DCs differentiated with Pv-AMA-1 display an upregulation of CD1a and HLA-DR (both antigen-presenting markers), reaching levels close to those displayed by healthy control individuals. These data corroborate the previous observation that differentiation of DCs with Pv-AMA-1 results in functionally activated rather than functionally impaired DCs [28]. The augmented expression of CD1a and HLA-DR on surface of DCs after in vitro activation with Pv-AMA-1 would be associated with antigen processing and presentation. In fact, we demonstrated that Pv-AMA-1 peptides, a result of antigen processing by DCs, were also recognized on cell surface by polyclonal antibodies. Although its overall recognition on cell surface was significantly increased (Fig. 4B), only a minor population of DCs expressed Pv-AMA-1 sub-products, which is likely associated to reduced exposure of epitopes when peptides are held in the MHC groove. Therefore, the activation of DCs by Pv-AMA-1, may potentially increase its ability to present the antigen, suggesting that vaccination of malaria-exposed individuals might partially overcome the suppression induced by natural infection. Of note, differentiation of DCs with Pv-MSP-1<sub>19</sub>, another blood-stage vaccine candidate expressed in the same conditions described for Pv-AMA-1, did not alter the expression of any surface markers studied (data not shown), suggesting a particular mechanism of induction of immunogenicity by the later antigen.

Interestingly, Pv-AMA-1 also elicits a pro-inflammatory cytokine profile that was observed after stimulation of PBMCs from malaria-infected subjects, including significant production of TNF-α, IL-12p40 and IFN-γ. Other cytokines such as IL-4, TGF-β and IL-10 were not detected after antigenic stimulation. IFN-γ, TNF-α and IL-12 have been classically implicated as essential mediators of protective immunity to blood-stage malaria [20,49,50]. Several studies suggest that protective immunity in experimental malaria is mediated by a cascade of events involving IL-12-induced production of IFN-γ and TNF-α [51]. In humans, IFN-γ production correlates with resistance to malaria reinfection [52] and protection from clinical attacks of the parasite [53]; TNF-α is associated with resolution of fever and parasite clearance [54]. Noteworthy, IFN-γ production induced by Pv-AMA-1 may reflect the immunological memory generated in the adaptive immunity of naturally infected individuals. Indeed, previous studies report that AMA-1 is recognized by PBMCs from donors with lifelong exposure to malaria, suggesting the presence of a robust but short lived T cell memory response [55,56]. On the other hand, since Pv-AMA-1 has direct effect on innate immunity eliciting production of both TNF-α and IFN-γ in malaria-naïve individuals [28], it is possible that the detected levels of those cytokines may be a consequence of both innate and adaptive immune responses. Finally, the production of pro-inflammatory cytokines might be a consequence of DC activation during malaria after contact with parasitic products as previously described by several authors [18,22,23,57]. Although controversial, it cannot be ruled out that even in the presence of down-modulated surface molecule expression, matured DCs may be still responsive to the malarial antigens. Nonetheless, further work is still necessary to investigate whether the observed down-modulation of DCs by malarial products would render a total suppression of these cells.

In conclusion, our findings show that, while malaria-infected subjects present modulation of DC maturation, Pv-AMA-1 elicits an upregulation of antigen-presenting molecules on the surface of monocyte-derived dendritic cells, and it is presented by AMA-1-stimulated DCs. Moreover, Pv-AMA-1 induces an immunological

profile of cytokines associated with clinical protection, which might be important in parasite control. These findings demonstrated that although cellular immune responses of malaria-infected individuals are down-modulated, immunization with Pv-AMA-1 may overcome this limitation and result in induced immunity that may be sufficient to impact parasite replication in vaccinated individuals. However, further evidence is still required from clinical trials in order to determine the adaptive immune response conferred by Pv-AMA-1 vaccination in humans and the association with protection.

## Acknowledgements

This work was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG (Grant #CBB APQ-0997-4.01/07). Lilian Bueno is supported by a Doctoral degree fellowship from CAPES/Brazil. Irene Soares, Oscar Bruna-Romero, Ricardo Fujiwara and Érika Braga are supported by Brazilian National Research Council (CNPq) fellowships.

## References

- Herrera S, Corradin G, Arevalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol* 2007;23(3):122–8.
- Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(6 Suppl):79–87.
- Prakash J, Singh AK, Kumar NS, Saxena RK. Acute renal failure in *Plasmodium vivax* malaria. *J Assoc Physicians India* 2003;51:265–7.
- Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis* 2005;11(1):132–4.
- Baird JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol* 2007;23(11):533–9.
- Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol* 2005;21(1):29–34.
- Vekemans J, Ballou WR. *Plasmodium falciparum* malaria vaccines in development. *Expert Rev Vaccines* 2008;7(2):223–40.
- Mahanty S, Saul A, Miller LH. Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria vaccines. *J Exp Biol* 2003;206(Pt 21):3781–8.
- Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJ, Kretzli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(4):582–7.
- Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol* 2008;24(2):74–84.
- Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 2001;69(5):3286–94.
- Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev* 2004;201:268–90.
- Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol* 2005;23:69–99.
- Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 2008;9(7):725–32.
- Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med* 1990;172(1):379–82.
- Bouharoun-Tayoun H, Ouevray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* 1995;182(2):409–18.
- Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 1998;4(3):358–60.
- Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol* 2006;176(1):441–50.
- Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 2002;169(6):2956–63.
- Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. *Infect Immun* 1996;64(1):44–9.
- Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, Clark IA. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* 1991;59(9):3280–3.
- Bruna-Romero O, Rodriguez A. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. *Infect Immun* 2001;69(8):5173–6.
- Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Kum-arb U, Hemmi H, Akira S, Krieg AM, et al. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol* 2004;172(8):4926–33.
- Ocana-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197(2):143–51.
- Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 1999;400(6739):73–7.
- Urban BC, Mwangi T, Ross A, Kinyanjui S, Mosobo M, Kai O, et al. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* 2001;98(9):2859–61.
- Skorokhod OA, Alessio M, Mordmuller B, Arese P, Schwarzer E. Hemozoin (malaria pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol* 2004;173(6):4066–74.
- Bueno LL, Fujiwara RT, Soares IS, Braga EM. Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-119 on the innate immune response. *Vaccine* 2008. doi:10.1016/j.vaccine.2007.12.031.
- Wykes MN, Good MF. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat Rev Microbiol* 2008;6(11):864–70.
- Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 2004;3:8.
- Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 1994;67(1):59–68.
- Healer J, Crawford S, Ralph S, McFadden G, Cowman AF. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun* 2002;70(10):5751–8.
- Wykes M, Keighley C, Pinzon-Charry A, Good MF. Dendritic cell biology during malaria. *Cell Microbiol* 2007;9(2):300–5.
- Ellis J, Ozaki LS, Gwadz RW, Cochrane AH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, et al. Cloning and expression in *E. coli* of the malaria sporozoite surface antigen gene from *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 1983;302(5908):536–8.
- Kemp DJ, Coppel RL, Cowman AF, Saint RB, Brown GV, Anders RF. Expression of *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in *Escherichia coli*: detection with antibodies from immune humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80(12):3787–91.
- Wykes M, Good MF. A case for whole-parasite malaria vaccines. *Int J Parasitol* 2007;37(7):705–12.
- Moorthy VS, Good MF, Hill AV. Malaria vaccine developments. *Lancet* 2004;363(9403):150–6.
- Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 2002;360(9333):610–7.
- Bousheri S, Cao H. New insight into the role of dendritic cells in malaria immune pathogenesis. *Trends Parasitol* 2008;24(5):199–200.
- Pouniotis DS, Proudfoot O, Bogdanoska V, Scalzo K, Kovacevic S, Coppel RL, et al. Selectively impaired CD8+ but not CD4+ T cell cycle arrest during priming as a consequence of dendritic cell interaction with *Plasmodium*-infected red cells. *J Immunol* 2005;175(6):3525–33.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179(4):1109–18.
- Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17(4):313–8.
- Elliott SR, Spurck TP, Dodin JM, Maier AG, Voss TS, Yosaatmadja F, et al. Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun* 2007;75(7):3621–32.
- Millington OR, Di Lorenzo C, Phillips RS, Garside P, Brewer JM. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during *Plasmodium* infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *J Biol* 2006;5(2):5.
- Perry JA, Olver CS, Burnett RC, Avery AC. Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. *J Immunol* 2005;174(10):5921–5.
- Braga EM, Carvalho LH, Fontes CJ, Kretzli AU. Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(3):299–303.
- Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2008;38(10):2697–705.
- Urban BC, Cordero D, Shafi MJ, Bull PC, Newbold CI, Williams TN, et al. The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria. *Infect Immun* 2006;74(12):6700–6.
- Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 1995;155(5):2545–56.
- Shear HL, Srinivasan R, Nolan T, Ng C. Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *J Immunol* 1989;143(6):2038–44.
- Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. *Folia Biol (Praha)* 2000;46(6):210–8.
- Luty AJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, et al. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection.

- tion with *Plasmodium falciparum* in young African children. J Infect Dis 1999;179(4):980–8.
- [53] Dodo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. J Infect Dis 2002;185(7):971–9.
- [54] Kremsner PG, Winkler S, Brandts C, Wildling E, Jenne L, Graninger W, et al. Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. Am J Trop Med Hyg 1995;53(5):532–8.
- [55] Lal AA, Hughes MA, Oliveira DA, Nelson C, Bloland PB, Oloo AJ, et al. Identification of T-cell determinants in natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in an adult population exposed to malaria. Infect Immun 1996;64(3):1054–9.
- [56] Udhayakumar V, Kariuki S, Kolczack M, Girma M, Roberts JM, Oloo AJ, et al. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. Am J Trop Med Hyg 2001;65(2):100–7.
- [57] McCall MB, Netea MG, Hermsen CC, Jansen T, Jacobs L, Golenbock D, et al. *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. J Immunol 2007;179(1):162–71.

# *Plasmodium vivax*: Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells during Infection Are Directly Associated with Level of Circulating Parasites

Lilian Lacerda Bueno<sup>1</sup>, Cristiane Guimarães Morais<sup>1</sup>, Fernanda Fortes Araújo<sup>2</sup>, Juliana Assis Silva Gomes<sup>2,3</sup>, Rodrigo Corrêa-Oliveira<sup>2</sup>, Irene Silva Soares<sup>4</sup>, Marcus Vinícius Lacerda<sup>5</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1,2</sup>, Érika Martins Braga<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil, **3** Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **4** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, Brazil

## Abstract

Circulation CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) have been associated with the delicate balancing between control of overwhelming acute malaria infection and prevention of immune pathology due to disproportionate inflammatory responses to erythrocytic stage of the parasite. While the role of Tregs has been well-documented in murine models and *P. falciparum* infection, the phenotype and function of Tregs in *P. vivax* infection is still poorly characterized. In the current study, we demonstrated that patients with acute *P. vivax* infection presented a significant augmentation of circulating Tregs producing anti-inflammatory (IL-10 and TGF-β) as well as pro-inflammatory (IFN-γ, IL-17) cytokines, which was further positively correlated with parasite burden. Surface expression of GITR molecule and intracellular expression of CTLA-4 were significantly upregulated in Tregs from infected donors, presenting also a positive association between either absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> and parasite load. Finally, we demonstrate a suppressive effect of Treg cells in specific T cell proliferative responses of *P. vivax* infected subjects after antigen stimulation with Pv-AMA-1. Our findings indicate that malaria vivax infection lead to an increased number of activated Treg cells that are highly associated with parasite load, which probably exert an important contribution to the modulation of immune responses during *P. vivax* infection.

**Citation:** Bueno LL, Morais CG, Araújo FF, Gomes JAS, Corrêa-Oliveira R, et al. (2010) *Plasmodium vivax*: Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells during Infection Are Directly Associated with Level of Circulating Parasites. PLoS ONE 5(3): e9623. doi:10.1371/journal.pone.0009623

**Editor:** Derya Unutmaz, New York University, United States of America

**Received:** December 22, 2009; **Accepted:** February 19, 2010; **Published:** March 10, 2010

**Copyright:** © 2010 Bueno et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG (Grant # CBB APQ-0997-4.01/07). Lilian Bueno is supported by a Doctoral degree fellowship from Brazilian National Research Council (CNPq/Brazil). Irene Soares, Ricardo Fujiwara, Rodrigo Correa-Oliveira and Erika Braga are supported by CNPq fellowships. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: embraga@icb.ufmg.br

## Introduction

Malaria is a major worldwide scourge, infecting and killing several millions of individuals each year [1]. Of the species that infect humans, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* are the two most important human malaria parasites. While deaths by *P. vivax* are rare compared to the *P. falciparum*, there is an increasing number of publications reporting severe disease, including respiratory distress and coma as a result of *P. vivax* infection [2,3]. Although the worldwide burden of *P. vivax* malaria has not been reliably estimated, the annual infections may range from 132 million to 391 million people [4] and 2.6 billion people living in areas of risk [5]. This disease affects poor people living in least developed and developing countries. Infection by this parasite may result in life-long learning impairment, incapacitating adults for work, with major direct economic consequences due to loss of productivity and depletion of the already meager financial resources [6]. Despite the importance of this disease, representing

the most prevalent recurrent malaria [7], the immunological mechanisms associated to the control of parasite levels and disease severity are not fully understood.

Protective cellular immune responses against malaria can be initiated by antigen-presenting cells (e.g. dendritic cells) that ultimately activate specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. The resulting protective Th1-dependent immune responses to blood-stage malaria infection [8] is largely mediated by IFN-γ and TNF-α [9]. These cytokines act synergistically to optimize nitric oxide production [10], which have been associated with parasite killing [11]. Paradoxically, the morbidity of acute malaria is associated with severe immune-mediated pathology due to disproportionate inflammatory responses to the erythrocytic stage of the parasite [12]. The delicate balancing between control of infection and prevention of immunopathology [13] is attributed to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs), which play an important role in maintaining immune homeostasis and controlling excessive immune responses [14]. These cells have been



shown to suppress cellular immune responses through direct contact with immune effector cells and by the production of regulatory cytokines, including TGF- $\beta$  and IL-10 [15].

Evidences of the role of Treg cells as suppressors of T cell responses in malaria were initially demonstrated in murine models, where these cells have been associated with increased [16,17] or delayed [18,19] parasite growth. Higher Treg cell numbers are associated with increased parasite load [20–22] and development of human infection caused by *P. falciparum* [23]. A functional deficit of Treg cells, characterized by reduced expression of CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) and FoxP3 (forkhead box P3 transcription factor), was observed in studies involving the Fulani ethnic group that present low susceptibility to clinical malaria by *P. falciparum* [24].

While the role of Tregs in malaria infection has been well-documented in murine models and *P. falciparum* infection, the association of Treg cells and *P. vivax* infection is still poorly understood. A recent study by Jangpatarapongsa and colleagues [25] demonstrated an increase on the number of IL-10-producing Treg cells in *P. vivax*-infected individuals. However, further phenotypic and functional characterization of Tregs cells in vivax malaria is still needed.

In the current study, we describe the augmentation of circulating Treg cells in peripheral blood of *P. vivax*-infected individuals and its possible association with parasite burden. We also show the expression of molecules (CTLA-4 and glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor - GITR) as well as pro- and anti-inflammatory cytokines associated with suppression by Tregs. Furthermore, the association between Treg subpopulations and parasitemia was evaluated. We also demonstrated these cells have a suppressive effect on *in vitro* T cell proliferative responses of individuals infected with *P. vivax*. Our results point to an increased numbers of activated Treg cells that are significantly associated with parasite load and may exert their function by modulating the immune responses during *P. vivax* infection.

## Materials and Methods

### Study Population and Blood Samples

Samples from 30 patients older than 18 years old with non-complicated *P. vivax* malaria were used in the study. All patients were resident in Manaus, the capital of the Amazonas State (Western Brazilian Amazon). The patients were unrelated outpatients being diagnosed at the Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Fifteen healthy adult blood donors were recruited for the study over the course of several months from Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, a non-endemic area for malaria. The study was approved by the Ethics Committee on Research with Humans of Universidade Federal de Minas Gerais (Protocol# ETIC 060/07). Blood was obtained after receiving the signed informed consent.

Venous blood was collected immediately before the beginning of the antimalarial treatment in EDTA and heparin-containing tubes (4 and 32 mL, respectively) and was used to prepare thick smears for microscopy, to extract parasite DNA and for PBMC isolation. Parasitological evaluation was performed by examination of 200 fields at 1,000 $\times$  magnification under oil-immersion. All slides were examined by at least two well-trained microscopists from the Brazilian Ministry of Health. The *P. vivax* mono-infection was confirmed by PCR as previously described [26]. Hemoglobin, hematocrit (HCT) and platelet levels were measured using an automated blood cell counter (ABX Pentra 90; Horiba Diagnostics, Kyoto, Japan) (Table 1). Correlation between platelet counts and the level of parasitemia and hemoglobin level and parasitemia

**Table 1.** Description of the study population by age and hematological parameters (Mean  $\pm$  SD).

Characteristics	Individuals	
	Malaria-infected <sup>†</sup> (n = 30)	Malaria-naïve (n = 15)
Age mean, years	37.6 $\pm$ 12.63	36.43 $\pm$ 11.96
Hemoglobin (g/dL)	12.8 $\pm$ 1.6*	16.1 $\pm$ 1.1
Platelets (cells/mm <sup>3</sup> )	96,600 $\pm$ 45,300*	184,400 $\pm$ 20,300
Parasitemia (parasites/ $\mu$ L)	4920 $\pm$ 3474	0

<sup>†</sup>*P. vivax* infection detected by parasitological smears and PCR.

\*Statistically different from control group ( $P < 0.0001$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0009623.t001

was determined for both infected and control donors (Figure S1A and S1B, respectively).

### Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained as previously described [27]. Briefly, cells were isolated from heparinized blood on a density gradient centrifugation (Histopaque<sup>®</sup>, Sigma Aldrich Co., USA) and were resuspended at a final concentration of  $1 \times 10^7$  cell/mL in RPMI 1640 medium (Invitrogen Co., USA) supplemented with 2 mM of L-glutamine (Sigma), 5% heat-inactivated human AB serum (Sigma) and 6% Antibiotic-Antimycotic solution (Invitrogen).

### Cell Phenotyping by Flow Cytometry and Intracellular Staining

PBMCs were stained using monoclonal antibodies to determine the expression of T regulatory cell markers (CD4, CD25 and FoxP3), and co-expression of GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), CD152/CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 and TGF- $\beta$ .

Cells were incubated with 2  $\mu$ L of undiluted monoclonal antibodies (all from BD Pharmingen, USA) conjugated either with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) or allophycocyanin (APC) in the dark for 30 min at room temperature. Intracellular staining for FoxP3, CTLA-4 and cytokines was performed using the eBioscience fixation/permeabilization buffer kit following manufacturer's instructions. After incubation, PBMCs were washed twice with 2 mL of phosphate-buffered saline containing 0.01% sodium azide followed by fixation in 200  $\mu$ L of fixative solution (10 g/L paraformaldehyde, 1% cacodylic acid, 6.65 g/L sodium chloride, 0.01% sodium azide). Phenotypic analyses were performed using a Becton Dickinson FACScalibur flow cytometer and the analysis was performed using the CellQuest software (BD Biosciences, USA) (Figure S2).

### Recombinant Pv-AMA-1

The recombinant protein representing amino acids 43 to 487 of Pv-AMA-1 [28,29] was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) at 37°C for 3 h by adding 0.1 mM isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG, Invitrogen), as previously described [27]. Pv-AMA-1 antigen was tested to determine the presence of Gram-negative bacterial endotoxin using a chromogenic Limulus Amebocyte Lysate test (QCL-1000, Cambrex, USA) according to the manufacturer's instruction, and was found to be a non significant source of endotoxins (levels lower than detection limit of 5 EU/mL).

### Analysis of the Effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells on *In Vitro* Cellular Proliferation to Pv-AMA-1

For the analysis of suppression activity, CFDA-SE labeled PBMCs from *P. vivax* infected individuals that presented positive proliferative responses for *P. vivax* AMA-1 antigen were co-incubated with autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isolated cells. CFDA-SE labeling of freshly isolated PBMCs (10<sup>6</sup> cells/mL in PBS/1% BSA) was performed by incubation of 0.4 μM CFDA-SE (Molecular Probes, USA) for 10 minutes at room temperature. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes (T regulatory cells) were purified from PBMCs by magnetic bead separation using a QuadroMACS cell separator (Miltenyi Biotec, USA). CD4<sup>+</sup> T cells (>97% purity) were purified by using a T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, USA), and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were enriched by a single-step positive selection using anti-CD25 microbeads (Miltenyi Biotec). All microbead isolations followed the manufacturer's instructions. The purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells were incubated at different concentrations (1:2, 1:5 and 1:10 ratios) with autologous CFDA-SE-labeled PBMCs pulsed with *P. vivax* AMA-1 (1 μg/well), for 96 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

The cell proliferative response of PBMCs co-incubated with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells was assessed using a Becton Dickinson FACScan flow cytometer. Data on 5 × 10<sup>4</sup> lymphocytes were acquired and the analysis was performed using the CellQuest software (BD Biosciences, USA). The results are expressed as CFDA-SE proliferation ratio, calculated by the proliferative response observed in co-cultures of Pv-AMA-1-stimulated PBMCs with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells over Pv-AMA-1-stimulated PBMCs only. Additional controls using antigen only or mitogen (PHA, Sigma, USA) were also included. CFDA-SE labeling of freshly isolated PBMCs (10<sup>6</sup> cells/mL in PBS/1% BSA) was performed by incubation of 0.4 μM CFDA-SE (Molecular Probes, USA) for 10 minutes at room temperature. Cells were washed and set up as described above.

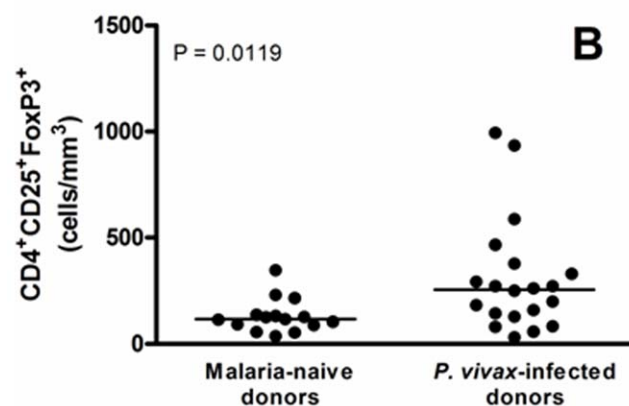
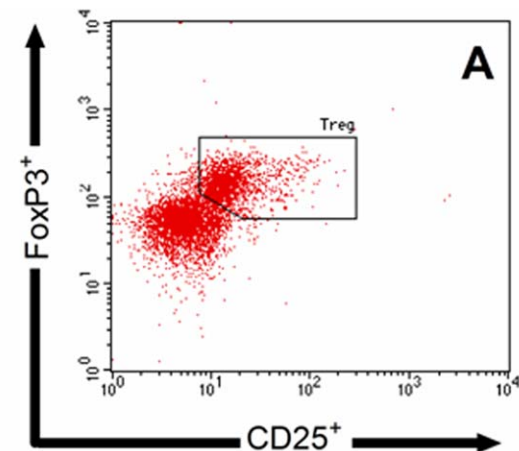
### Statistical Analysis

The one-sample Kolmogorov-Smirnoff test was used to determine whether variability followed a normal distribution pattern. P values were determined by two-tailed Mann-Whitney U test. Correlation analysis was performed using Spearman rank correlation. A P value < 0.05 was considered significant. All statistics were carried out using Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.) software.

## Results

### Regulatory T Cell Frequency Is Elevated in *P. vivax* Infected Donors

Regulatory T cells were identified by flow cytometry as CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells expressing both CD25 and FoxP3 markers (Figure 1A) and are reported as absolute numbers of cells per mm<sup>3</sup>. Our data clearly show that number of Treg cells was significantly increased in *P. vivax*-infected subjects (median = 256.2 cells/mm<sup>3</sup>) when compared to malaria-naïve donors (median = 116.5 cells/mm<sup>3</sup>) (P = 0.0119, Figure 1B). Further analysis show that frequency of Treg cells (demonstrated by proportion of positive cells) were also elevated in *P. vivax*-infected subjects (P = 0.0009, Figure S3A). Although the difference of both absolute number and proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells between infected and control donors, the level of expression of FoxP3 was similar in both groups (P = 0.0833, data not shown). Since the increased absolute number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells



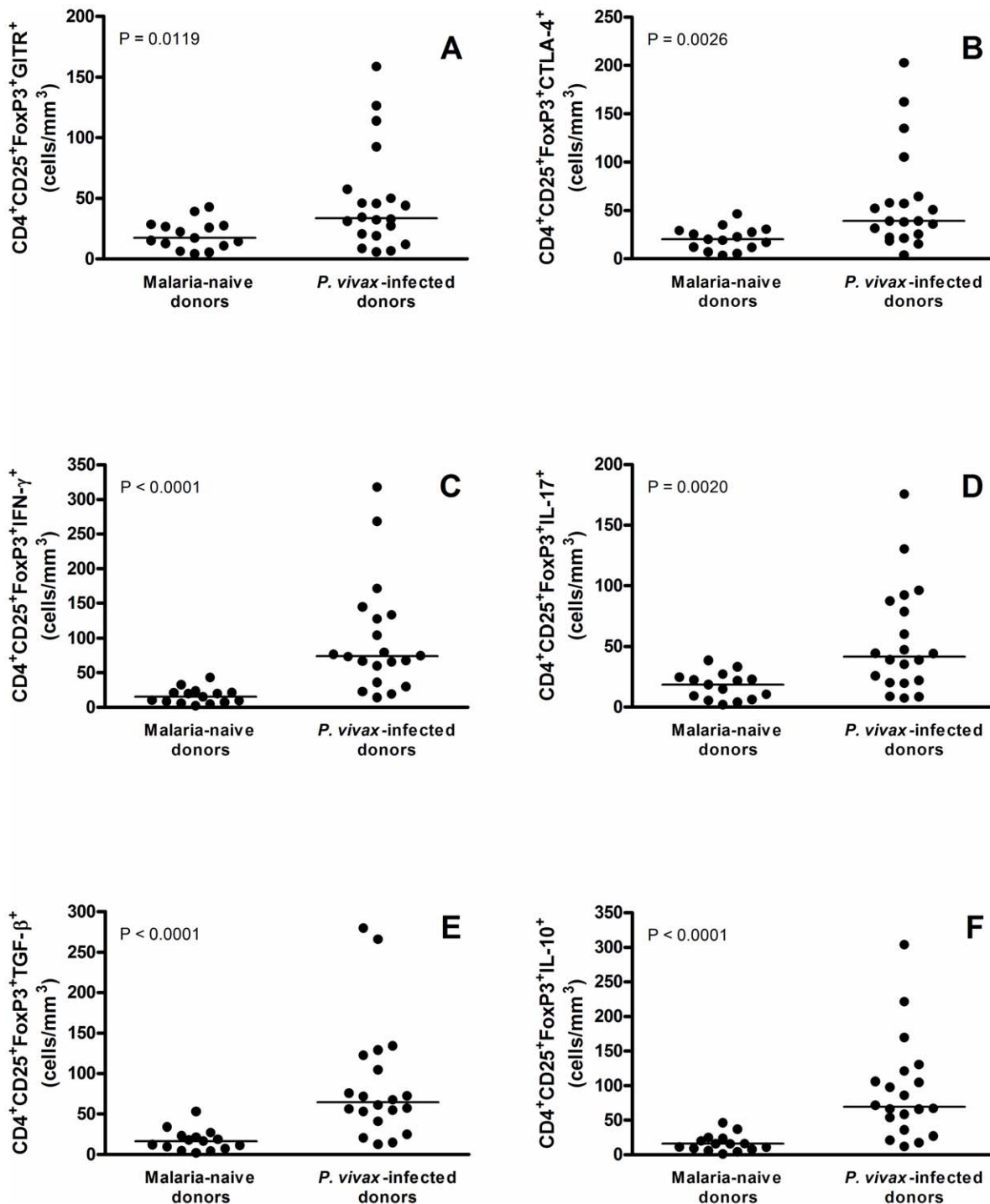
**Figure 1. Flow cytometric analysis of regulatory T cells. (A) CD25 and FoxP3 expression in gated CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> lymphocytes.** Dot plot show a representative data of 35 donors examined. (B) Absolute numbers of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors (n = 15 and 20, respectively). Absolute numbers (cells/mm<sup>3</sup>) are indicated on Y-axis and lines represent median. Statistical differences were detected using Mann-Whitney U test and are indicated on the graph with significant P values.

doi:10.1371/journal.pone.0009623.g001

would reflect a possible augmentation of total CD4<sup>+</sup> lymphocytes, the number of total CD4<sup>+</sup> cells was also analyzed. No difference in the absolute number of this lymphocyte population was observed between malaria infected and naïve individuals (data not shown).

### Peripheral Blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Subpopulations Are Also Augmented in *P. vivax* Infected Donors

Once observed the elevated number of Treg cells in the peripheral blood of infected donors, we further characterized this cell population by evaluating the expression of molecules and cytokines associated with cell modulation. Surface expression of the GITR molecule and intracellular expression of CTLA-4 and cytokines were evaluated by flow cytometry. *P. vivax*-infected individuals presented a significant increase of circulating GITR<sup>+</sup> (P = 0.0119, Figure 2A) and CTLA-4<sup>+</sup> Treg cells (P = 0.0026,

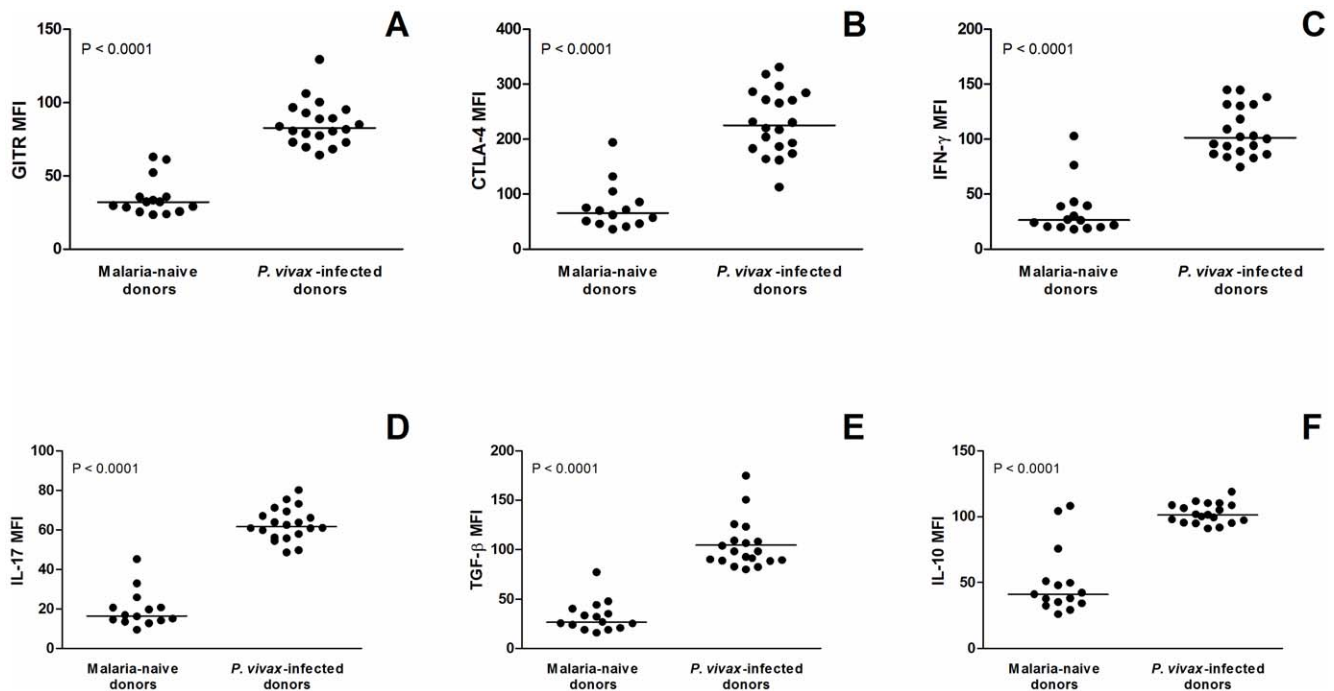


**Figure 2. Flow cytometric analysis of surface markers (CTLA-4 and GITR) and cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-17, TGF- $\beta$ , and IL-10) in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors (n = 15 and 20, respectively).** Results were expressed as absolute numbers of cells expressing (A) GITR, (B) CTLA-4, (C) IFN- $\gamma$ , (D) IL-17, (E) TGF- $\beta$ , and (F) IL-10. Absolute numbers (cells/mm<sup>3</sup>) are indicated on Y-axis and lines represent median. Statistical differences were detected using Mann-Whitney U test and are indicated on the graphs with significant P values.

doi:10.1371/journal.pone.0009623.g002

Figure 2B), when compared to malaria-naïve donors. Flow cytometric analysis also showed a significant increase on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$  (P<0.0001), IL-17 (P=0.0020), TGF- $\beta$  (P<0.0001) and IL-10 (P<0.0001) (Figures 2C to 2F) in malaria-infected individuals. Similar results

were observed when proportion of cells expressing CTLA-4<sup>+</sup>, TGF- $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , and IL-17 were analyzed (Figures S3C to S3G, P<0.05 for all). No differences in the proportion of GITR<sup>+</sup> between infected and control individuals was observed (P = 0.3866, Figure S3B).



**Figure 3. Expression of surface markers (CTLA-4 and GITR) and cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-17, TGF- $\beta$ , and IL-10) on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors (n = 15 and 20, respectively).** Results were expressed as median intensity of fluorescence (lines represent median) for (A) GITR, (B) CTLA-4, (C) IFN- $\gamma$ , (D) IL-17, (E) TGF- $\beta$ , and (F) IL-10 on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. Statistical differences were detected using Mann-Whitney U test and are indicated on the graphs with significant P values. doi:10.1371/journal.pone.0009623.g003

#### Expression of CTLA-4, GITR, TGF- $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ and IL-17 Is Upregulated in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Cells from *P. vivax* Infected Donors

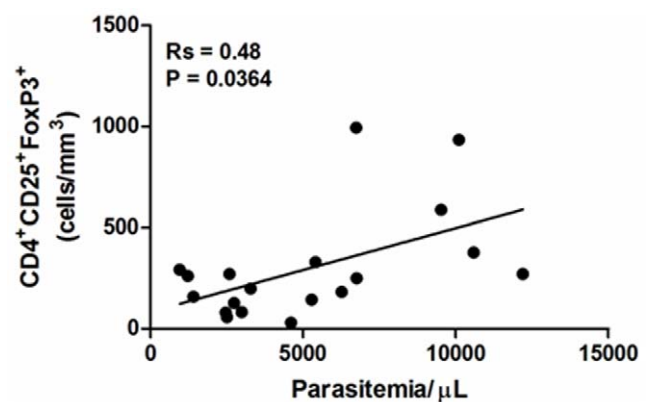
The expression of analyzed surface and intracellular markers was determined by median intensity of fluorescence in order to obtain the absolute expression level per cell basis. Following the increase in the absolute numbers of Treg subpopulations, *P. vivax* infected donors presented a significant higher expression level of all markers tested (CTLA-4, GITR, TGF- $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-17) on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells when compared to those observed on malaria-naïve subjects ( $P < 0.0001$  for all, Figure 3).

#### Absolute Number of Treg Cells Correlates with Parasite Burden in *P. vivax*-Infected Individuals

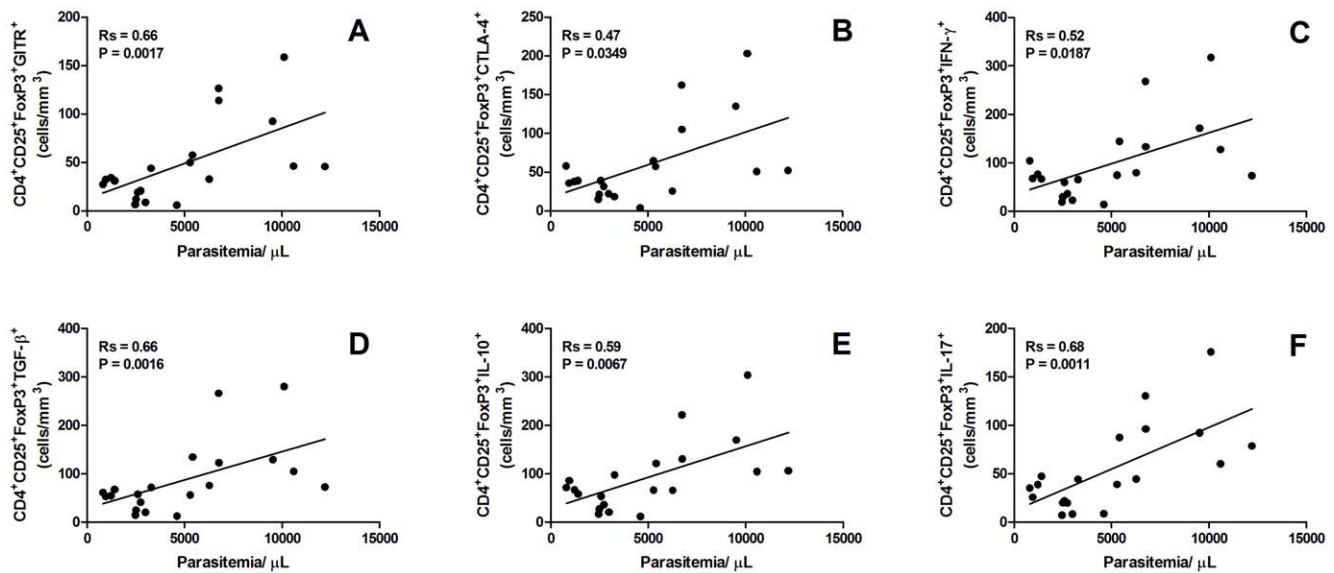
The significantly higher absolute number of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells observed in parasitized donors (Figure 1) suggested that this cell population may have an important role during malaria infection. To further evaluate whether there is a direct correlation between these two variables, the absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg cells were correlated with the levels of parasitemia (Figure 4). The data clearly shows that the number of peripheral Treg cells increases with the level of parasitemia ( $R_s = 0.48$ ,  $P = 0.0364$ ) in *P. vivax* infected individuals. Similar significant correlations were also observed between parasitemia and absolute numbers of Treg expressing GITR ( $R_s = 0.66$ ,  $P = 0.0017$ ), CTLA-4 ( $R_s = 0.47$ ,  $P = 0.0349$ ), IFN- $\gamma$  ( $R_s = 0.52$ ,  $P = 0.0187$ ), TGF- $\beta$  ( $R_s = 0.66$ ,  $P = 0.0016$ ), IL-10 ( $R_s = 0.59$ ,  $P = 0.0067$ ) and IL-17 ( $R_s = 0.68$ ,  $P = 0.0011$ ) (Figure 5). These data may imply a direct association between increased parasite number, CTLA-4 and GITR expression and possibly cytokine production.

#### CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Cells Regulate Antigen-Specific PBMC Proliferation in *P. vivax*-Infected Individuals

In order to determine the possible effect of Treg cells on the immune response during malaria infection, a functional assay was designed to evaluate whether CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg cells can modulate the *in vitro* immune response to parasite antigen. When isolated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were added to the *in vitro* cultures (independent of cell ratio) of Pv-AMA-1-stimulated PBMCs obtained from two individuals (previously selected due to positive *in vitro* proliferative responses after antigen stimulation) a significant reduction on the cell proliferative response elicited by



**Figure 4. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells are directly correlated with parasite burden.** The relationship between absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and degree of parasitaemia among 20 patients with *Plasmodium vivax* malaria was examined using Spearman rank correlation. doi:10.1371/journal.pone.0009623.g004



**Figure 5. Correlation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell co-expressing (A) GITR, (B) CTLA-4, (C) IFN- $\gamma$ , (D) TGF- $\beta$ , (E) IL-10, and (F) IL-17 and degree of parasitaemia among 20 patients with *Plasmodium vivax* malaria.** Statistical significance was determined by Spearman rank correlation.

doi:10.1371/journal.pone.0009623.g005

the recombinant Pv-AMA-1 antigen was observed (Figure 6). These results suggest that these cells do have the capacity to modulate the *in vitro* response at least to this *P. vivax*-specific antigenic preparation. No significant differences were observed in cultures stimulated with PHA for all tested individuals (data not shown).

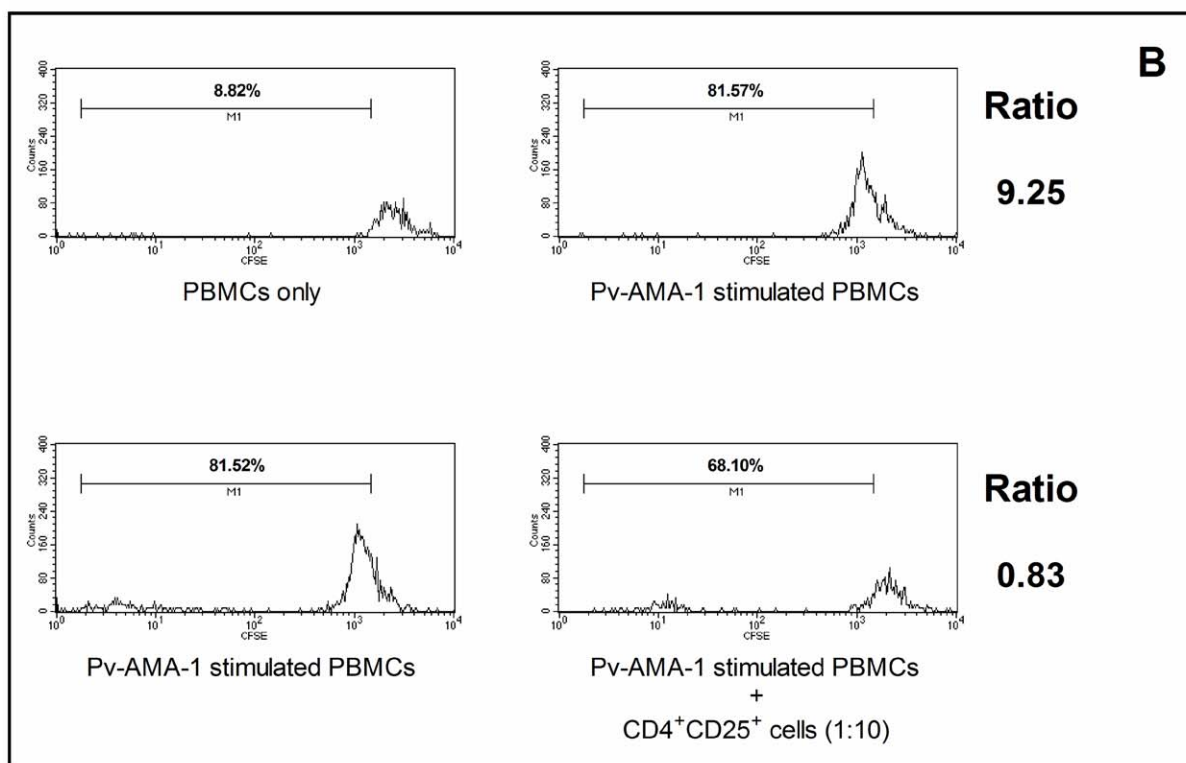
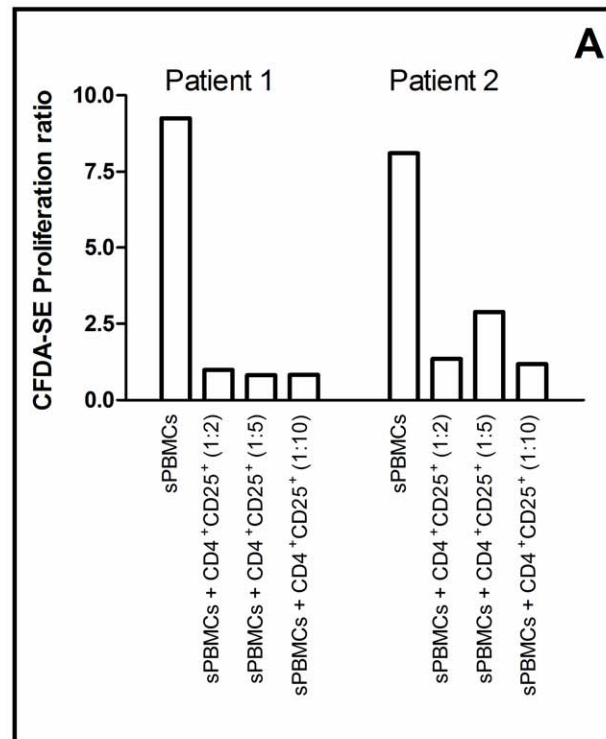
## Discussion

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells, also known as T regs, play an important role maintaining immune homeostasis and controlling excessive immune responses [14]. These cells suppress cellular immune responses through direct contact with immune effector cells and by production of regulatory cytokines, including TGF- $\beta$  and IL-10 [15]. Over the past four decades, since its first description in the early 1970's [30,31], several studies have focused to describe the role of Tregs in infectious diseases (reviewed in [15,32]), including tuberculosis [33], hepatitis C [34], leishmaniasis [35,36], helminthiasis [37–40] and malaria [16–20,22,41–44]. Although consistent evidence based on experimental models and human *P. falciparum* infection suggest that Tregs may contribute to the onset of infection, the role of these cells during malaria and the possible mechanisms of regulation are not yet fully elucidated. Furthermore, the association of Treg cells and *P. vivax* infection is still poorly understood.

In the current study, we initially showed that *P. vivax*-naturally infected individuals present a significant augmentation of circulating Treg cells in peripheral blood, as previously demonstrated in murine and *P. falciparum* infections [20,41,42]. Of note, while absolute number and proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells is higher in malaria infected individuals, no differences were observed for number/proportion of CD4<sup>+</sup> lymphocytes. The expansion of Tregs in the above settings has been significantly associated with increased or delayed parasite growth [16–19] as well as with increased parasite load [20–22] and development of clinical malaria [23]. Indeed, herein we also observe a positive correlation between

absolute numbers of Treg cells and parasite burden in *P. vivax* malaria. Although the number of peripheral Treg cells increases according to the level of parasitemia, the relationship between number of parasites and host's regulatory T cell activity is still not clear. However, it is possible that increased Treg activity may trigger modulation of host immune response and consequently predisposes to parasite survival and/or failure in the control of parasite multiplication. On the other hand, increased Treg responses might also account for limitation of exacerbated infection-induced pathology, which would be lately beneficial to the host.

A variety of potential mediators of Treg activity that could contribute to the suppression of the host's immune response have been identified, including GITR [45,46], CTLA-4 [47], FoxP3 [48,49], and the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  [50–52]. Our results show a significant increase of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> lymphocytes in *P. vivax*-infected donors, which was further correlated with level of parasitemia observed in the same individuals. Interestingly, a higher expression of these markers on per cell basis was also seen in *P. vivax*-infected donors. Both GITR and CTLA-4 molecules are constitutively expressed on cell surface of natural Tregs [32] and are regulated by FoxP3 expression [53,54]. Initial studies related to the effects of GITR-signaling on Treg cells indicated that interaction of this receptor with agonist antibody or GITR ligand (GITRL) lead to an apparent abrogation of suppressive activity of Tregs [45,46,55]. However, although not essential for the T cell suppressor activity [54], the engagement of GITR promotes proliferation of Tregs [54,56] and potential enhancement of their suppressive function [55]. Nonetheless, the augmentation of circulating number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> co-expressing GITR in *P. vivax* infected subjects might partially reflect the expansion of Tregs observed in those individuals. In this context, we suggest that proliferation of Treg cells in these individuals is elicited by GITR expression, which is possibly upregulated by FoxP3 expression. Although the effect of GITR signaling in Treg cells of *P. vivax* infected donors



**Figure 6. Indirect suppression elicited by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells from *P. vivax*-infected individuals.** (A) CFDA-SE Proliferation ratio of Pv-AMA-1- stimulated PBMCs (sPBMCs) and sPBMCs co-cultured with different proportions of autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes (1:2, 1:5 and 1:10, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells: sPBMCs). Results are expressed for two malaria-infected donors who presented positive proliferative response after Pv-AMA-1 stimulation. (B) Representative FACS histogram plots for 1 out 2 donors with positive proliferative response after Pv-AMA-1 stimulation showing CFDA-SE staining after antigen stimulation and co-culturing with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. CFDA-SE Proliferation ratio for sPBMCs was calculated by proliferative response observed in Pv-AMA-1-stimulated PBMCs (indicated by positivity for CFDA-SE) divided by basal proliferative response of non-stimulated cells (PBMCs only). CFDA-SE Proliferation ratio for co-cultured cells were calculated by proliferative response observed in Pv-AMA-1-stimulated PBMCs with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells divided by proliferative response observed in Pv-AMA-1-stimulated PBMCs only.

doi:10.1371/journal.pone.0009623.g006

was not established, evidences from murine malaria suggest that infection alter GITR signaling in Tregs, and this eventually contributes to the escape of parasites from host T cell immunity [57].

The inhibitory receptor CTLA-4 presents partial homology to CD28 molecule and interacts to the same ligands, CD80 and CD86, with a much higher affinity [58]. The suppressive effect of CTLA-4 is associated with the reduced IL-2 production and IL-2 receptor expression, and by arresting T cells at the G1 phase of the cell cycle [59,60]. Moreover, CTLA-4 expressing Treg cells induce the expression of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by antigen-presenting cells which degrades tryptophan, and the lack of this essential amino acid inhibits T cell activation and promotes T cell apoptosis [61]. An indirect evidence of the role of this receptor in experimental malaria has been demonstrated by the *in vivo* blockade of CTLA-4 using specific monoclonal antibody, leading to an exacerbation of *P. berghei*-mediated immunopathology [19,62]. Although the potential functional role of CTLA-4 in regulatory T cell activity remains controversial [63], the increased number of CTLA-4<sup>+</sup> Treg cells in *P. vivax*-infected donors suggests that regulation may occur through direct contact between antigen-presenting cells and Tregs after engagement of the CTLA-4 pathway. Moreover, since the number of CTLA-4<sup>+</sup> Tregs is positively associated with parasitemia, it may suggest the involvement of this receptor on the outcome of human malaria. A reduced expression of CTLA-4 was observed in the Fulani ethnic group, contributing to their lower susceptibility to malaria infection and suggesting that alterations in the maturation process of Treg in Fulani individuals may also account for the generation of a lower number of Treg [24].

In this study, patients with acute *P. vivax* infection presented a significant augmentation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells producing the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$ , which also correlated positively with parasite burden. Both cytokines exert a critical role on the regulation of type-1 response in experimental malaria [21] and contribute to Treg cell suppressive activity *in vivo* [64]. This regulatory activity may limit the malaria-induced inflammation, therefore preventing the severity of clinical malaria. However, although IL-10 and TGF- $\beta$  are naturally produced by Tregs [32] and are required to induce FoxP3 expression [65], it is not clear whether or how parasite replication might influence the production of these cytokines. Conversely, we also observed an increased number of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells that produce IFN- $\gamma$  and IL-17 in peripheral blood of *P. vivax*-infected donors, which also correlated with the levels of parasitemia. Recently, Scholzen and colleagues [65] demonstrated the intracellular production of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-17, by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs with intermediate (also described as effector T cells) rather than high expression of FoxP3 molecule, suggesting the presence of different subsets of T regulatory cells during malaria. In our study, however, we did not observe any correlation between Foxp3 expression levels and production of all intracellular cytokines assessed (data not shown). Nevertheless, the role of these pro-inflammatory cytokines in malaria-elicited Tregs still remains to be addressed.

Based in our results, we show that malaria-infected individuals present an increased amount of activated Treg cells in the peripheral blood, observed by increased numbers of Treg subpopulations expressing cell surface molecules and mediators associated with suppression of immune responses. Moreover, we show that the same malaria-infected donors had an increased expression of all markers tested. These results might partially

explain the reduction of antigen-specific proliferative responses previously demonstrated in individuals infected with malaria [66], and higher plasmatic IL-10 levels in acute *P. vivax* infection [25]. Indeed, evidence from functional assays show that augmentation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells abrogates antigen-specific proliferation of PBMCs from infected individuals, suggesting the role of Tregs during malaria infection. Of note, the ability of Treg cells to abrogate *P. falciparum*-induced cell proliferation in the Fulani population is directly associated to a reduced expression of genes related to suppressive activity. Depletion of Treg cells in Fulani individuals did not significantly increase the proliferation of PBMCs in response to *P. falciparum* antigens, whereas it restored an optimal response to the same antigens in the sympatric highly susceptible Mossi population [24]. Finally, we show that an increased number of circulating Tregs in acute infected individuals is associated with parasite load. In fact, regulatory T cells might limit infection-mediated pathology but also compromise clearance of malaria-infected red blood cells [21]. Whether the function of Tregs is beneficial to the host or to parasite remains to be elucidated. Further studies are still required to support the association of regulatory T cells and immunosuppression in a diverse *P. vivax* infection clinical presentation.

## Supporting Information

**Figure S1** Correlation between hemoglobin levels (A) and platelet counts (B) and the degree of parasitaemia among patients with *Plasmodium vivax* malaria. Statistical significance was determined by Spearman rank correlation.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009623.s001 (0.10 MB TIF)

**Figure S2** FACS analysis. Representative FACS histogram plots for 1 out 35 donors expressing (A) GITR, (B) CTLA-4, (C) IFN- $\gamma$ , (D) IL-17, (E) TGF- $\beta$ , and (F) IL-10 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells were initially gated according to Figure 1A. Histogram plots were used to determine the percentage of positive cells and median intensity of fluorescence (MFI) for each stain (M1 indicates positive population).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009623.s002 (0.13 MB TIF)

**Figure S3** Flow cytometric analysis of regulatory T cells indicating proportion of total and subpopulations of Treg cells. Results are expressed as percentage of positive cells for (A) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup>, (C) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, (D) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, (E) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, (F) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, and (G) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> in malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors (n = 15 and 20, respectively). Proportions of positive cells (%) are indicated on Y-axis and lines represent median. Statistical differences were detected using Mann-Whitney U test and are indicated on the graphs with significant P values.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009623.s003 (0.21 MB TIF)

## Acknowledgments

We are grateful for Michelle Groenner who helped in the field and laboratory activities.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LLB RTF EMB. Performed the experiments: LLB CGM FFA JASG. Analyzed the data: LLB CGM RTF. Contributed reagents/materials/analysis tools: JASG RCO IS MVL RTF EMB. Wrote the paper: LLB RTF EMB. Improved the paper with comments: RC-O IS.

## References

- Volkman SK, Barry AE, Lyons EJ, Nielsen KM, Thomas SM, et al. (2001) Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor. *Science* 293: 482–484.
- Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, et al. (2005) *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis* 11: 132–134.
- Prakash J, Singh AK, Kumar NS, Saxena RK (2003) Acute renal failure in *Plasmodium vivax* malaria. *J Assoc Physicians India* 51: 265–267.
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW (2004) The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 4: 327–336.
- Guerra CA, Snow RW, Hay SI (2006) Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol* 22: 353–358.
- Baird JK (2007) Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol* 23: 533–539.
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R (2001) The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64: 97–106.
- Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM (2006) Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol* 176: 441–450.
- Artavanis-Tsakonas K, Riley EM (2002) Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 169: 2956–2963.
- Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM (1996) In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. *Infect Immun* 64: 44–49.
- Rockett KA, Auburn MM, Cowden WB, Clark IA (1991) Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* 59: 3280–3283.
- Schofield L, Grau GE (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5: 722–735.
- Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM (2003) The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 133: 145–152.
- Sakaguchi S, Powrie F (2007) Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317: 627–629.
- Belkaid Y (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7: 875–888.
- Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, et al. (2004) Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med* 10: 29–30.
- Amante FH, Stanley AC, Randall LM, Zhou Y, Haque A, et al. (2007) A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* 171: 548–559.
- Nie CQ, Bernard NJ, Schofield L, Hansen DS (2007) CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T-cell function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. *Infect Immun* 75: 2275–2282.
- Long TT, Nakazawa S, Onizuka S, Huaman MC, Kanbara H (2003) Influence of CD4+CD25+ T cells on *Plasmodium berghei* NK65 infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 33: 175–183.
- Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, et al. (2005) Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23: 287–296.
- Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L (2006) Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol* 28: 35–49.
- Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, et al. (2009) Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog* 5: e1000402.
- Todryk SM, Bejon P, Mwangi T, Plebanski M, Urban B, et al. (2008) Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4 CD25 high T cells with susceptibility in Kenyans. *PLoS One* 3: e2027.
- Torcia MG, Santarlasci V, Cosmi L, Clemente A, Maggi L, et al. (2008) Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 646–651.
- Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, et al. (2008) *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 38: 2697–2705.
- Scoppel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM (2004) Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 3: 8.
- Bueno LL, Fujiwara RT, Soares IS, Braga EM (2008) Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-1<sub>19</sub> on the innate immune response. *Vaccine* doi:10.1016/j.vaccine.2007.12.031.
- Narum DL, Thomas AW (1994) Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 67: 59–68.
- Healer J, Crawford S, Ralph S, McFadden G, Cowman AF (2002) Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun* 70: 5751–5758.
- Gershon RK, Kondo K (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18: 723–737.
- Gershon RK, Kondo K (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21: 903–914.
- Belkaid Y, Rouse BT (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6: 353–360.
- Hougardy JM, Verscheure V, Lochet C, Mascart F (2007) In vitro expansion of CD4+CD25highFOXP3+CD127low/- regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy *Mycobacterium tuberculosis*-infected humans. *Microbes Infect* 9: 1325–1332.
- Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, Price DA, Gostick E, et al. (2008) Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J Virol* 82: 5043–5053.
- Boureau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, et al. (2009) Intralésional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun* 77: 1465–1474.
- Rodrigues OR, Marques C, Soares-Clemente M, Ferronha MH, Santos-Gomes GM (2009) Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology* 214: 101–111.
- McSorley HJ, Harcus YM, Murray J, Taylor MD, Maizels RM (2008) Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *J Immunol* 181: 6456–6466.
- Matera G, Giaccotti A, Scalise S, Pulicari MC, Maselli R, et al. (2008) *Ascaris lumbricoides*-induced suppression of total and specific IgE responses in atopic subjects is interleukin 10-independent and associated with an increase of CD25(+) cells. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62: 280–286.
- Finney CA, Taylor MD, Wilson MS, Maizels RM (2007) Expansion and activation of CD4+CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur J Immunol* 37: 1874–1886.
- Watanabe K, Carter JM, Neely-Burnam M, Colley DG (2009) Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Parasite Immunol* 31: 440–446.
- Cambos M, Belanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T (2008) Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol* 38: 229–238.
- Vigario AM, Gorgette O, Dujardin HC, Cruz T, Cazenave PA, et al. (2007) Regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental *Plasmodium* infection but do not prevent cerebral malaria. *Int J Parasitol* 37: 963–973.
- Wu Y, Wang QH, Zheng L, Feng H, Liu J, et al. (2007) *Plasmodium yoelii*: distinct CD4(+)CD25(+) regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Exp Parasitol* 115: 301–304.
- Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, et al. (2009) Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* 5: e1000364.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, et al. (2002) CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16: 311–323.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S (2002) Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3: 135–142.
- Chen W, Jin W, Wahl SM (1998) Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med* 188: 1849–1857.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057–1061.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330–336.
- Shevach EM, Tran DQ, Davidson TS, Andersson J (2008) The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 38: 915–917.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG (2002) The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129: 263–276.
- Cools N, Van Tendeloo VF, Smits EL, Lenjou M, Nijs G, et al. (2008) Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. *J Cell Mol Med* 12: 690–700.
- Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, et al. (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16: 1643–1656.



54. Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C (2007) GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol* 37: 1165–1169.
55. Shevach EM, Stephens GL (2006) The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol* 6: 613–618.
56. Nishioka T, Nishida E, Iida R, Morita A, Shimizu J (2008) In vivo expansion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells mediated by GITR molecules. *Immunol Lett* 121: 97–104.
57. Hisaeda H, Hamano S, Mitoma-Obata C, Tetsutani K, Imai T, et al. (2005) Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family-related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection. *Eur J Immunol* 35: 3516–3524.
58. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 1: 220–228.
59. Krummel MF, Allison JP (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182: 459–465.
60. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, et al. (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405–413.
61. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, et al. (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 1206–1212.
62. Jacobs T, Graefe SE, Niknafs S, Gaworski I, Fleischer B (2002) Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. *J Immunol* 169: 2323–2329.
63. Bour-Jordan H, Blueston JA (2002) CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol* 22: 1–7.
64. von Boehmer H (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6: 338–344.
65. Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M (2009) *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFβ. *PLoS Pathog* 5: e1000543.
66. Braga EM, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU (2002) Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 66: 299–303.

**Interleukin-17 producing T helper cells (Th17) are increased during natural  
*Plasmodium vivax* infection**

Lilian Lacerda Bueno<sup>1</sup>, Cristiane Guimarães Morais<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Lacerda<sup>2</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1,3,4</sup>, Érika Martins Braga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil;

<sup>3</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil.

Corresponding author:

Érika Martins Braga

Av. Antônio Carlos 6627,

31270-901 Belo Horizonte (MG) Brasil

Ph. +55 31 34092876/Fax. +55 31 34092970

E-mail: [embraga@icb.ufmg.br](mailto:embraga@icb.ufmg.br)

## **ABSTRACT**

Recent evidences have demonstrated the importance of Th17 cells in host defense against infectious diseases. However, little is known about their role in parasitic infections. Here, we showed that uncomplicated acute vivax malaria induce a significant expansion of Th17 cells associated to a pro-inflammatory cytokine profile. Furthermore, we demonstrated a correlation between numbers of Th17 cells and circulating CD4<sup>+</sup> T-cells producing IFN- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$ . Finally, correlations between number of Th17 cells and morbidity or parasitemia were not detected. Further studies are underway to investigate whether Th17 cells are critically involved in the immunity against *Plasmodium vivax* infection.

Keywords: *Plasmodium vivax* ,Th17, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10

## 1. INTRODUCTION

Interleukin 17 (IL-17)-producing T helper cells (Th17 cells) are a well-established independent subset of T helper cells initially associated to the pathogenesis of chronic inflammatory and autoimmune diseases [1]. Th17 differentiation is regulated by the transcription factors signal transducer and activator of transcription 2 (STAT3), retinoic acid receptor-related orphan receptor- $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) and aryl hydrocarbon receptor, and is driven by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-1 and IL-6 [2]. These cells largely contribute to inflammation by recruitment of neutrophils and induction of secretion of several pro-inflammatory mediators, including IL-1, IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), chemokines and metalloproteinases [1, 3]. Recent studies suggest that Th17 cells are also involved in host defense against bacterial, fungal and protozoal infection [4-6].

Malaria poses as a relevant public health problem worldwide, infecting and killing several millions of individuals each year [7]. Knowledge of the mechanisms leading to protective immunity against malaria is still scarce and, over the past decades, it has been restricted to studies focused in experimental malaria and *Plasmodium falciparum* infection. Although protective immune responses to blood-stage malaria infection are mediated by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [8], acting synergistically to optimize nitric oxide production [9] and further parasite killing [10], the morbidity of acute malaria is also associated with severe immune-mediated pathology due to disproportionate inflammatory responses to the erythrocytic stage of the parasite [11]. Indeed, several studies have shown an association between severe disease and the enhanced amounts of pro-inflammatory cytokine responses, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$  [12].

*Plasmodium vivax*, the most widespread species, is the major cause of malaria outside Africa, mainly afflicting Asia and the Americas [13]. Infection by this parasite may result in life-long learning impairment, incapacitating adults for work, with major direct economic consequences due to loss of productivity and depletion of the already meager financial resources [14]. Despite the importance of this disease [15], the immunological mechanisms associated to the control of parasite levels and disease severity are not fully established.

Herein, we showed, for the first time, that absolute numbers of circulating IL-17-producing CD4<sup>+</sup> cells (Th17) are significantly elevated during natural malaria vivax infection, which is further correlated with other cytokines associated with host immune regulation.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Study population and blood samples

This study concerned 20 blood samples from outclinic patients with uncomplicated *P. vivax* malaria that were collected at endemic areas of Manaus (Amazonas state). The patients were unrelated, as there were no family clusters, and they were attended and diagnosed at the Fundação de Medicina Tropical of Manaus. Fifteen healthy adult blood donors were recruited for the study over the course of several months from Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, a non-endemic area for malaria. The study was approved by the Ethical Committee on Research of Universidade Federal de Minas Gerais (Protocol# ETIC 060/07). Blood was obtained after receiving the informed consent. Venous blood was collected in EDTA and heparin-containing tubes (4 and 32 mL, respectively) and was used to prepare thick smears for microscopy, to extract parasite DNA and PBMC isolation. Parasitological evaluation was performed by examination of 200 fields at 1.000× magnification under oil-immersion. All slides were examined by three well-trained microscopists from the Brazilian Ministry of Health. The *P. vivax* mono-infection was confirmed by PCR as previously described [16]. Infected individuals presented parasitemia levels of  $4,920 \pm 3,474$  parasites/ $\mu$ L. The mean average of age in naturally infected and control groups were  $37.6 \pm 12.6$  and  $36.4 \pm 11.9$ , respectively. Hemoglobin, hematocrit (HCT) and platelet levels were measured using a blood cell counter (ABX Pentra 90; Horiba Diagnostics, Kyoto, Japan).

## *2.2 Isolation of peripheral blood mononuclear cells*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained as previously described [17]. Briefly, cells were isolated from heparinized blood on a density gradient centrifugation (Histopaque<sup>®</sup>, Sigma Aldrich Co., USA) and were resuspended at final concentration of  $1 \times 10^7$  cell/mL in RPMI 1640 medium (Invitrogen Co., USA) supplemented with 2 mM of L-glutamine (Sigma), 5% heat-inactivated human AB serum (Sigma) and 6% Antibiotic-Antimycotic solution (Invitrogen).

## *2.3 Cell phenotyping by flow cytometry and intracellular staining*

PBMCs were stained using monoclonal antibodies to determine the expression of Th17 cells (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup>), and co-expression of IFN- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$ . The following monoclonal antibodies conjugated either with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), or peridinin chlorophyll protein complex (PerCP) were used in the phenotypic analysis: FITC anti-human CD3 (clone UCHT1), PerCP anti-human CD4 (clone BNI3), PE anti-human IL-10 (clone JES3-9D7), PE anti-human TGF- $\beta$  (clone TB21), PE anti-human IL-17 (clone 64CAP17) (all from BD Pharmingen, USA). Cells were incubated with 2  $\mu$ L of undiluted monoclonal antibodies in the dark for 30 min at room temperature. Intracellular staining for cytokines was performed using the eBioscience fixation/permeabilization buffer kit following manufacturer's instructions. After incubation, PBMCs were washed twice with 2 mL of phosphate-buffered saline containing 0.01% sodium azide followed by fixation in 200  $\mu$ L of fixative solution (10 g/L paraformaldehyde, 1% cacodylic acid, 6.65 g/L sodium chloride). Phenotypic analyses were performed using a Becton Dickinson FACScan flow cytometer. Data on 5

$\times 10^4$  lymphocytes (gated by forward and side scatter properties) were collected and the analysis was performed using the CellQuest software (BD Biosciences, USA).

#### *2.4 Statistical analysis*

The one-sample Kolmogorov-Smirnoff test was used to determine whether variable was normally distributed. The maximum residual test (Grubb's test) was used to detect possible outliers. P values were determined by two-tailed Mann-Whitney U test. Correlation analysis was performed using Spearman rank correlation. A P value  $< 0.05$  was considered significant. All statistics were carried out using Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.).



### 3. RESULTS

#### *3.1 Frequency of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> (Th17) cells is significantly elevated in P. vivax infected donors*

Th17 cells were identified by flow cytometry as CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells with intracellular expression of IL-17 and are reported as absolute numbers of cells per mm<sup>3</sup>. Th17 cell frequency was significantly increased in *P. vivax*-infected subjects (median = 159.5 cells/mm<sup>3</sup>) when compared to malaria-naïve donors (median = 25.9 cells/mm<sup>3</sup>) (P < 0.0001, Figure 1).

#### *3.2 Pro-inflammatory pattern of intracellular cytokine expression during natural P. vivax infection*

Once we demonstrated an elevated number of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> lymphocytes in the peripheral blood of infected donors, we further assessed the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in samples from the same naturally infected individuals. *P. vivax*-infected individuals also presented a significant increase of circulating IFN-γ<sup>+</sup> (median = 181.1 cells/mm<sup>3</sup>) when compared to malaria-naïve donors (median = 133.2 cells/mm<sup>3</sup>) (P = 0.0219, Figure 2A). Conversely, the frequency of CD4<sup>+</sup> T cells producing IL-10 was decreased *P. vivax*-infected subjects (median = 141.0 cells/mm<sup>3</sup>) when compared to non-infected healthy controls (median = 526.9 cells/mm<sup>3</sup>) (P < 0.0001, Figure 2B). No differences were observed in the expression of TGF-β by CD4<sup>+</sup> T cells between infected and control donors (medians of 277.4 cells/mm<sup>3</sup> and 205.2 cells/mm<sup>3</sup>, respectively) (Figure 2C).

*3.3 Absolute number of Th17 cells correlates with IFN- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$  production but not with parasitemia and hematological parameters in malaria-infected individuals*

In infected patients, absolute Th17 cell numbers were directly correlated with IFN- $\gamma$  ( $R_s = 0.887$ ,  $P < 0.0001$ ), IL-10 ( $R_s = 0.897$ ,  $P < 0.0001$ ) and TGF- $\beta$  ( $R_s = 0.893$ ,  $P < 0.0001$ ) production (Figure 3). No significant correlations were observed between absolute number of peripheral Th17 cells and parasitemia, hemoglobin or platelet levels (data not shown).

#### 4. DISCUSSION

Among the pleiotropic effects of the IL-17A and IL-17F produced by Th17 cells, the induction of pro-inflammatory cytokines and chemokine expression, as a consequence of the recruitment and activation of several leukocyte lineages, may represent an important immune pathway involved in host defense in both protective or detrimental manner, depending on the pathogen and infection conditions [5]. Indeed, few controversial studies in protozoan infections have demonstrated that Th17 cells may mediate protection against *Trypanosoma cruzi* [6] and *Toxoplasma gondii* [5] in murine models or promote pathogenesis in human cutaneous leishmaniasis [18] but also in *T. gondii* infection [19], suggesting that the role of Th17 cells in parasitic diseases remains to be elucidated. Furthermore, the association of this T helper subset and *Plasmodium* infection is still poorly understood.

In the current study, we initially showed that *P. vivax*-naturally infected individuals present a significant augmentation of circulating Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) cells in peripheral blood. However, no correlations between absolute number of peripheral Th17 cells and hematological parameters (levels of hemoglobin and number of platelets) or parasitemia were observed. Although our results do not allow clear conclusions concerning the effect of Th17 cells in pathogenesis or protection, Ishida and collaborators [20] demonstrated that *il-17<sup>-/-</sup>* knockout mice infected with *P. berghei* ANKA developed experimental cerebral malaria and presented parasitemia at similar levels to wild-type mice. Interestingly, the production of IL-17 by CD4<sup>+</sup> cells in malaria was previously been demonstrated in T regulatory cells [21, 22], which may reflect a T regulatory cell reprogramming to the Th17 phenotype in the presence of the cytokines TGF- $\beta$  and IL-6

[1]. In vitro, there is a close relationship between Th17 and Treg developmental cell program [23] and the balance between these cells may drive the susceptibility or resistance against the parasite in malaria infection.

Protective cellular immune response against malaria can be initiated by antigen-presenting cells that ultimately activate specific CD4<sup>+</sup>, leading to control of blood-stage malaria infection mediated by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [8]. In the current study, we showed that natural *P. vivax* infection elicited a pro-inflammatory cytokine profile, characterized by significant increased expression of IFN- $\gamma$  and reduction of IL-10 by circulating CD4<sup>+</sup> T cells. Furthermore, our results demonstrate a direct correlation between absolute numbers of Th17 cells and circulating CD4<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$ . Since the concomitant production of cytokines was not assessed in these individuals, it is not possible to assure that Th17 cells are producing IFN- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$  or it might solely reflect a coincidental expansion of these CD4<sup>+</sup> cell subpopulations. Interestingly, recent evidences have shown that Th17 are also a source of IFN- $\gamma$  and IL-10 [24, 25], but further studies are still necessary to determine the precise function of Th17 cells coexpressing IFN- $\gamma$  or IL-10. Nonetheless, the consequence of increased production of IL-17 and IFN- $\gamma$  in *P. vivax*-infected individuals would render in a pro-inflammatory environment, including induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS), antimicrobial peptides and other cytokines, leading to a favorable immune response against the parasite.

In conclusion, our findings show that malaria-infected subjects present a significant increase of IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood, which are associated with the production of IFN- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$  eventhough a pro-

inflammatory pattern was observed during vivax malaria infection. Further studies are currently underway to investigate whether Th17 cells are critically involved in the immunity against *Plasmodium vivax* infection.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

This work was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG (Grant # CBB APQ-0997-4.01/07) and Pronex Malaria, DECIT/MS (555646/2009-2). Lilian Bueno is supported by a Doctoral degree fellowship from CNPq/Brazil. Ricardo Fujiwara and Érika Braga are supported by Brazilian National Research Council (CNPq) fellowships.

## REFERENCES

- [1] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo, IL-17 and Th17 Cells, *Annu Rev Immunol* 27 (2009) 485-517.
- [2] S. L. Gaffen, Structure and signalling in the IL-17 receptor family, *Nat Rev Immunol* 9 (2009) 556-567.
- [3] J. K. Kolls, A. Linden, Interleukin-17 family members and inflammation, *Immunity* 21 (2004) 467-476.
- [4] G. Matsuzaki, M. Umemura, Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections, *Microbiol Immunol* 51 (2007) 1139-1147.
- [5] Y. Iwakura, S. Nakae, S. Saijo, H. Ishigame, The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens, *Immunol Rev* 226 (2008) 57-79.
- [6] Y. Miyazaki, S. Hamano, S. Wang, Y. Shimano, Y. Iwakura, H. Yoshida, IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection, *J Immunol* 185 (2010) 1150-1157.
- [7] S. K. Volkman, A. E. Barry, E. J. Lyons, K. M. Nielsen, S. M. Thomas, M. Choi, S. S. Thakore, K. P. Day, D. F. Wirth, D. L. Hartl, Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor, *Science* 293 (2001) 482-484.

- [8] K. Artavanis-Tsakonas ,E. M. Riley, Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, *J Immunol* 169 (2002) 2956-2963.
- [9] P. Jacobs, D. Radzioch ,M. M. Stevenson, In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice, *Infect Immun* 64 (1996) 44-49.
- [10] K. A. Rockett, M. M. Awburn, W. B. Cowden ,I. A. Clark, Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives, *Infect Immun* 59 (1991) 3280-3283.
- [11] L. Schofield ,G. E. Grau, Immunological processes in malaria pathogenesis, *Nat Rev Immunol* 5 (2005) 722-735.
- [12] J. Langhorne, F. M. Ndungu, A. M. Sponaas ,K. Marsh, Immunity to malaria: more questions than answers, *Nat Immunol* 9 (2008) 725-732.
- [13] R. N. Price, E. Tjitra, C. A. Guerra, S. Yeung, N. J. White ,N. M. Anstey, Vivax malaria: neglected and not benign, *Am J Trop Med Hyg* 77 (2007) 79-87.
- [14] J. K. Baird, Neglect of *Plasmodium vivax* malaria, *Trends Parasitol* 23 (2007) 533-539.
- [15] K. Mendis, B. J. Sina, P. Marchesini ,R. Carter, The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria, *Am J Trop Med Hyg* 64 (2001) 97-106.



- [16] K. K. Scopel, C. J. Fontes, A. C. Nunes, M. F. Horta, E. M. Braga, Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region, *Malar J* 3 (2004) 8.
- [17] L. L. Bueno, R. T. Fujiwara, I. S. Soares, E. M. Braga, Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-119 on the innate immune response, *Vaccine* 26 (2008) 1204-1213.
- [18] O. Bacellar, D. Faria, M. Nascimento, T. M. Cardoso, K. J. Gollob, W. O. Dutra, P. Scott, E. M. Carvalho, Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis, *J Infect Dis* 200 (2009) 75-78.
- [19] R. Guiton, V. Vasseur, S. Charron, M. T. Arias, N. Van Langendonck, D. Buzoni-Gatel, B. Ryffel, I. Dimier-Poisson, Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice, *J Infect Dis* 202 (2010) 427-435.
- [20] H. Ishida, C. Matsuzaki-Moriya, T. Imai, K. Yanagisawa, Y. Nojima, K. Suzue, M. Hirai, Y. Iwakura, A. Yoshimura, S. Hamano, C. Shimokawa, H. Hisaeda, Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17, *Biochem Biophys Res Commun* 402 (2010) 790-795.
- [21] A. Scholzen, D. Mittag, S. J. Rogerson, B. M. Cooke, M. Plebanski, *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells is independent

- of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta, PLoS Pathog 5 (2009) e1000543.
- [22] L. L. Bueno, C. G. Morais, F. F. Araujo, J. A. Gomes, R. Correa-Oliveira, I. S. Soares, M. V. Lacerda, R. T. Fujiwara, E. M. Braga, Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites, PLoS One 5 (2010) e9623.
- [23] A. Kimura, T. Kishimoto, IL-6: regulator of Treg/Th17 balance, Eur J Immunol 40 (2010) 1830-1835.
- [24] M. H. Lexberg, A. Taubner, I. Albrecht, I. Lepenies, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch, H. D. Chang, IFN-gamma and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells, Eur J Immunol 40 (2010) 3017-3027.
- [25] M. J. McGeachy, K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, D. J. Cua, TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology, Nat Immunol 8 (2007) 1390-1397.



Figure 2

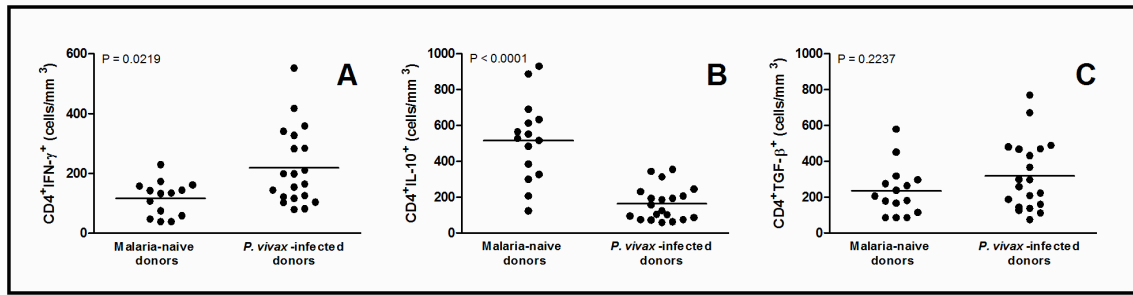
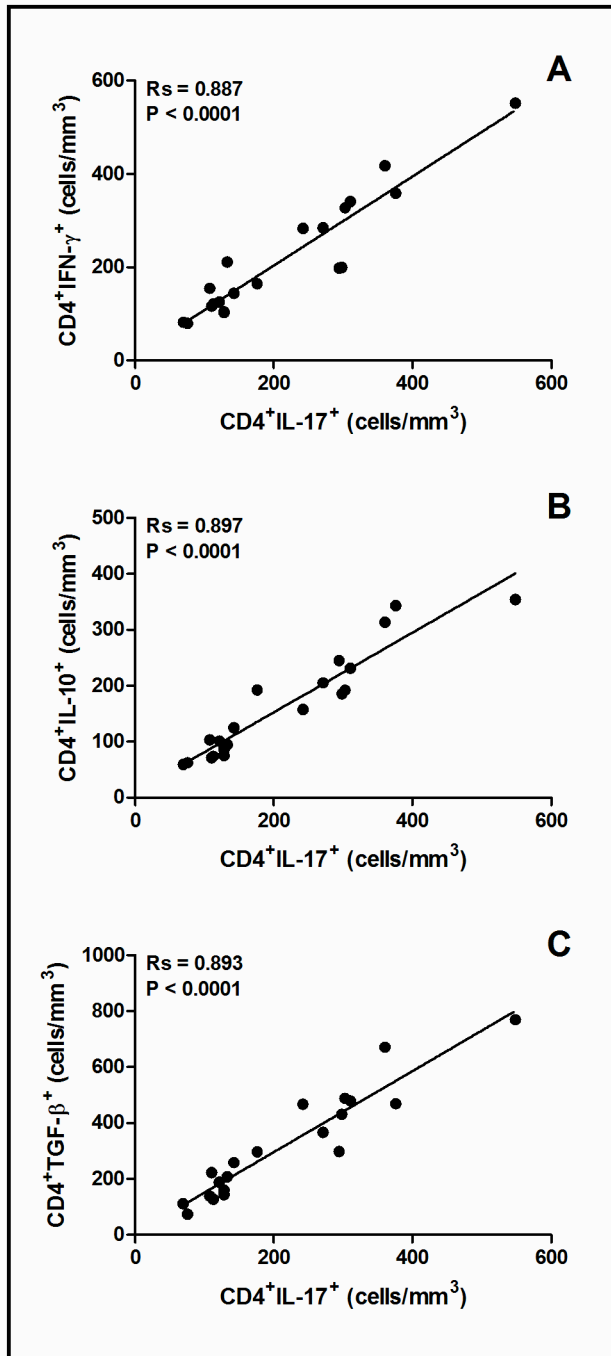


Figure 3



## FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Flow cytometric analysis of IL-17-producing T CD4<sup>+</sup> cells. Absolute numbers of circulating CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells (Th17 cells) in malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors (n = 15 and 20, respectively). Absolute numbers (cells/mm<sup>3</sup>) are indicated on Y-axis and lines represent median. Statistical differences were detected using Mann-Whitney U test and are indicated on the graph with significant P values.

Figure 2 – Flow cytometric analysis of cytokine production (IFN- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$ ) in gated CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes from malaria-naïve and *P. vivax*-infected donors (n = 15 and 20, respectively). Results were expressed as absolute numbers of CD4<sup>+</sup> cells expressing (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-10 and (C) TGF- $\beta$ . Absolute numbers (cells/mm<sup>3</sup>) are indicated on Y-axis and lines represent median. Statistical differences were detected using Mann-Whitney U test and are indicated on the graphs with significant P values.

Figure 3 – Correlation of absolute numbers of circulating IL-17-producing T helper (Th17) cells and absolute number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells co-expressing (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-10, and (C) TGF- $\gamma$  among 20 patients with *Plasmodium vivax* malaria. Statistical significance was determined by Spearman rank correlation.

1 **Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax***  
2 **apical membrane antigen 1 (AMA-1)**

3

4 Lilian Lacerda Bueno<sup>1</sup>, Francisco Pereira Lobo<sup>1</sup>, Cristiane Guimarães Morais<sup>1</sup>, Luíza  
5 Carvalho Mourão<sup>1</sup>, Ricardo Andrez Machado de Ávila<sup>2</sup>, Irene Silva Soares<sup>3</sup>, Cor Jesus  
6 Fontes<sup>4</sup>, Marcus Vinícius Lacerda<sup>5</sup>, Carlos Chavez Olórtgui<sup>2</sup>, Daniella Castanheira  
7 Bartholomeu<sup>1,7</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1,6,8</sup>, Érika Martins Braga<sup>1</sup>

8

9 <sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal  
10 de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

11 <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas,  
12 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

13 <sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, Brazil;

14 <sup>4</sup>Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brazil;

15 <sup>5</sup>Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil;

16 <sup>6</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, FIOCRUZ, Belo  
17 Horizonte, Brazil;

18 <sup>7</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas (INCTV), Brazil;

19 <sup>8</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil.

20

21

22 Corresponding author:

23 Érika Martins Braga

24 Av. Antônio Carlos 6627,

25 31270-901 Belo Horizonte (MG) Brasil

26 Ph. +55 31 34092876/Fax. +55 31 34092970

27 E-mail: embraga@icb.ufmg.br

28

29 **ABSTRACT**

30 Apical membrane antigen 1 (AMA-1) is considered a major candidate antigen for  
31 a malaria vaccine. Previous immunoepidemiological studies of naturally acquired  
32 immunity to *Plasmodium vivax* AMA-1 (PvAMA-1) have shown the higher prevalence  
33 of specific antibodies to domain II (DII). In the present study, we confirmed that specific  
34 antibody responses from naturally infected individuals were highly reactive to both full-  
35 length AMA-1 and DII. Also we demonstrated a strong association between AMA-1 and  
36 DII IgG and IgG subclass responses. We analyzed the primary sequence of PvAMA-1 for  
37 B cell linear epitopes co-occurring with intrinsically unstructured/disordered regions  
38 (IURs). The B cell epitope comprising the amino acid sequence 290-307 of PvAMA-1  
39 (SASDQPTQYEEEMTDYQK), with the highest prediction scores, was identified in  
40 domain II and further selected for chemical synthesis and immunological testing. The  
41 antigenicity of the synthetic peptide was identified by serological analysis using sera  
42 from *P. vivax* infected individuals who were knowingly reactive to PvAMA-1  
43 ectodomain only, to domain II only, or reactive to both antigens. While the synthetic  
44 peptide was recognized by all serum samples specific to domain II, serum with reactivity  
45 only to the full-length protein presented 58.3% of positivity. Moreover, IgG reactivity  
46 against PvAMA-1 and domain II after depletion of specific synthetic peptide antibodies  
47 was reduced in 18% (P = 0.1882) and 33% (P = 0.0254), respectively. These results  
48 suggest that this linear epitope is highly antigenic during natural human infections and an  
49 important antigenic region of the domain II of PvAMA-1, suggesting its possible future  
50 use in pre-clinical studies.

51

52



## 53 INTRODUCTION

54 Malaria is one of the most debilitating parasitic diseases of humans, with an  
55 estimated 225 million clinical cases and 781,000 deaths per year [1]. Of the species that  
56 infect humans, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* are the two most  
57 important human malaria parasites. Although deaths by *P. vivax* are rare compared to the  
58 *P. falciparum*, vivax malaria has an enormous socioeconomic impact [2] and is now  
59 recognized as a cause of severe and fatal malaria [3]. There are an increasing number of  
60 publications reporting severe disease, including respiratory distress, severe anemia and  
61 coma as a result of *P. vivax* infection [4,5]. Considering the emergence of chloroquine  
62 resistance [5,6] and evidence of *P. vivax* strains with lower sensitivity to primaquine [7],  
63 the development of a safe and affordable vaccine would be an important addition to  
64 control strategies for infectious diseases like malaria. Unfortunately, despite decades of  
65 research effective malaria vaccines are still not available [8].

66 Several asexual blood-stage antigens have been identified as potential vaccine  
67 candidates and are strongly supported by evidences from studies of experimental models  
68 [9,10] and immune recognition demonstrated in exposed individuals in malaria endemic  
69 areas [11,12,13,14,15,16]. Among several vaccine candidates, the Apical Membrane  
70 Antigen-1 (AMA-1) is a well-characterized and functionally important merozoite protein  
71 and is currently considered a major candidate antigen for a malaria vaccine [17]. AMA-1  
72 is a type I transmembrane protein and is expressed in the late asexual schizont stage of  
73 the *Plasmodium* parasite and accumulates in the micronemes of developing merozoites.  
74 Just prior to red blood cell (RBC) invasion, the mature form of the protein is transported  
75 to the merozoite surface membrane as an 83 kDa protein in *P. falciparum* or as a 66 kDa

76 in the other malaria species where it is concentrated at the apical pole [18]. Once on the  
77 surface, this form is redistributed and undergoes two C-terminal cleavages, giving rise to  
78 48-kD and 44-kD soluble forms [19,20,21,22]. AMA-1 is well conserved in all  
79 *Plasmodium* species examined and also present in other apicomplexan parasites  
80 [23,24,25,26]. While its precise role is still unknown, the crucial role of AMA-1 in the  
81 invasion process was clearly established [26,27,28,29]. Several studies have  
82 demonstrated the association of AMA-1 with erythrocyte binding [30,31] and  
83 reorientation of merozoites on the surface of red blood cells [29].

84 The AMA-1 ectodomain contains three distinct domains (I, II, and III) defined by  
85 eight intra-molecular disulfide bonds [32]. Several reports have previously shown that  
86 DII present a high degree of amino acid sequence conservation [33,34,35] and is  
87 particularly the most immunogenic region of both *P. falciparum* [36] and *P. vivax* AMA-  
88 1 (PvAMA-1) [37] ectodomains. The determination of short and specific antigenic and/or  
89 immunogenic regions within vaccine candidates would represent an advantage over  
90 recombinant subunit vaccine development once it may facilitate a large-scale production  
91 and generation of chimeric peptides containing multiple relevant malarial epitopes.

92 In the present study, we describe the identification of a highly antigenic linear B  
93 cell epitope within PvAMA-1 vaccine candidate and its further recognition from naturally  
94 *P. vivax*-infected individuals. We confirmed that DII presented similar antigenicity than  
95 the ectodomain, even when all IgG isotypes were evaluated. Our results add further  
96 support to the development of PvAMA-1-based subunit vaccine against malaria vivax  
97 infection.

98

99

## 100 **MATERIALS AND METHODS**

### 101 **Study population and blood samples**

102 A total of 214 blood samples from outclinic patients with uncomplicated *P. vivax* malaria  
103 were collected at endemic areas of Manaus (Amazonas state) and Cuiabá (Mato Grosso  
104 state). All patients were unrelated, as there were no family clusters, and they were  
105 attended and diagnosed at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado,  
106 Manaus or Hospital Júlio Muller (Universidade Federal do Mato Grosso). Twenty healthy  
107 adult blood donors were recruited for the study over the course of several months from  
108 Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, a non-endemic area for malaria. The study  
109 was approved by the Ethical Committee on Research of Universidade Federal de Minas  
110 Gerais (Protocol# ETIC 060/07). Blood was obtained after receiving the informed consent.

111 Venous blood was collected and was used to prepare thick smears for microscopy, to  
112 extract parasite DNA and serum separation. Parasitological evaluation was performed by  
113 examination of 200 fields at 1.000× magnification under oil-immersion. All slides were  
114 examined by three well-trained microscopists from the Brazilian Ministry of Health. The  
115 *P. vivax* mono-infection was confirmed by PCR as previously described [38]. Infected  
116 individuals presented parasitemia levels of  $3,726 \pm 9,624$  parasites/ $\mu$ L. The mean average  
117 of age in naturally infected and control groups were  $38.6 \pm 14.0$  and  $36.4 \pm 11.9$ ,  
118 respectively.

119

### 120 **Recombinant Pv-AMA-1 and Domain II of Pv-AMA-1 (DII)**

121 The recombinant proteins representing amino acids 43 to 487 of Pv-AMA-1 (ectodomain)  
122 [39,40] and the domain II (amino acids 249 to 385) of Pv-AMA-1 were expressed in

123 *Escherichia coli*, as previously described [37,39]. Briefly, the recombinant plasmid pHis-  
124 AMA-1 or pET-28a-AMA-1-DII were transformed into *E. coli* BL-21 (DE3) expression  
125 host cells (Novagen, USA). Protein expression was obtained by inoculating 8 ml of a  
126 culture grown overnight in 200 ml of Luria broth (Invitrogen, USA) containing 100µg/ml  
127 ampicillin (pHis-AMA-1) or 30µg/ml kanamycin (pET-28a-AMA-1-DII) (Sigma, USA).  
128 The culture was grown with continuous shaking at 37°C to an optical density of 0.6-0.8 at  
129 600 nm and then induced for 3 hours under constant agitation at 37°C in the presence of  
130 0.1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen). The recombinant  
131 proteins were obtained from pellet (ectodomain) or supernatant (domain II) of the  
132 bacterial lysates as follows.

133 The pellet containing PvAMA-1 ectodomain was processed for protein purification  
134 essentially as described previously [37]. Briefly, the insoluble fraction, containing mostly  
135 inclusion bodies, was washed four times with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0,  
136 1% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPSO, Sigma).  
137 The washed inclusion bodies were then solubilized under continuous agitation in 10 mM  
138 sodium phosphate buffer, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 10% (vol/vol) glycerol containing 8 M  
139 urea, at room temperature for 2 h. After centrifugation at 23,000 g at 4°C for 30 min, the  
140 supernatant was loaded onto a 1 ml column of pre-equilibrated Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose resin  
141 (Qiagen). The column was extensively washed with solubilization buffer containing 5  
142 mM imidazole (Sigma) and then washed stepwise with decreasing concentrations of urea  
143 (6 to 1 M) in refolding buffer (20 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, 0.5 M NaCl,  
144 10% glycerol, 5 mM imidazole, 0.5 mM oxidized glutathione, 5 mM reduced glutathione  
145 and 0.1% Triton X-100). Impurities were washed with five bed volumes of refolding

146 buffer containing 80 mM imidazole and PvAMA-1 was eluted with refolding buffer  
147 containing 0.1 to 0.4 M imidazole gradient. Fractions were analyzed by SDS-PAGE and  
148 stained with Coomassie blue. The fractions, containing highly purified recombinant  
149 protein, were extensively dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, 150  
150 mM NaCl, 50% glycerol, 0.1 mM DTT. Protein concentration was determined by the  
151 Bradford method (Bio-Rad) using bovine serum albumin (BSA, Sigma) as the standard.

152         The domain II of PvAMA-1 was purified as previously described [37]. Briefly,  
153 the supernatant containing soluble proteins was applied to a column with Ni<sup>2+</sup>-NTA-  
154 Agarose resin previously equilibrated (sodium phosphate buffer 20 mM, pH 8.0, 0.5 M  
155 NaCl). Bound proteins were eluted with a linear 0.1 to 0.4 M imidazole gradient in wash  
156 buffer (sodium phosphate buffer 20 mM, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF and 20%  
157 glycerin, pH 7.0). Fractions containing the recombinant proteins with a high degree of  
158 purity were pooled and dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. After centrifugation at  
159 18,000g for 30 min at 4°C and filtration through a 0.22 µm membrane, the recombinant  
160 protein was purified by ion-exchange chromatography using an AKTA FPLC (GE  
161 Healthcare, Amersham, UK). The proteins were eluted with a linear 0-1 M NaCl gradient  
162 in Tris-HCl buffer. 1 ml fractions were collected and analyzed by SDS PAGE. Fractions  
163 containing the recombinant proteins with a high degree of purity were pooled and  
164 extensively dialyzed against PBS. The protein concentration was determined as described  
165 above.

166 Both ectodomain and domain II of Pv-AMA-1 antigen were tested to determine the  
167 presence of Gram-negative bacterial endotoxin using a chromogenic Limulus Amebocyte  
168 Lysate test (QCL-1000, Cambrex, USA) according to the manufacturer's instruction, and

169 was found to be a non-significant source of endotoxins (levels lower than detection limit  
170 of 5 EU/mL).

171

### 172 **Sequence data**

173 To predict possible antigenic properties in AMA-1 using bioinformatic tools, the entire  
174 PvAMA-1 sequence (Salvador strain, Accession Number AAC16731) was downloaded  
175 from NCBI website ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)). The signal peptide and the C-  
176 terminal portion (corresponding to the transmembrane helix and intracellular portion)  
177 were manually removed in order to obtain the ectodomain sequence.

178

### 179 **Prediction of B cell epitopes**

180 Prediction of B cell epitopes was carried out using the program BepiPred [41]. This  
181 software takes as input a single sequence in FASTA format and each amino acid receives  
182 a prediction score based on known Hidden Markov Models profiles of known antigens as  
183 well as in propensity scale methods based on hydrophilicity and secondary structure  
184 prediction. The lowest cutoff of 0.35 (as suggested in the BepiPred website) was used in  
185 at least nine consecutive amino acids in order to consider a given region as a valid linear  
186 B cell epitope. The epitope score represents the average of the scores of individual amino  
187 acids above the cutoff.

188

### 189 **Prediction of intrinsically unstructured/disordered proteins and domains**

190 Prediction of intrinsically unstructured/disordered regions (IURs) was carried out using  
191 program IUPred [42]. This software takes as input a single sequence in FASTA format

192 and predicts the potential IURs. IURs do not possess sufficient interresidue interactions to  
193 provide the stabilizing energy to overcome the entropy loss during folding, therefore  
194 adopting loop structures. The final output is an individual score for each aminoacid that  
195 ranges from 0 (completely ordered) to 1 (completely unordered). IURs were then  
196 predicted as a region spanning at least 9 contiguous aminoacids with individual IUPred  
197 prediction score for each aminoacid above 0.35. Bio::Graphics and *in-house* perl scripts  
198 were used to integrate the output of BepiPred and IUPred prediction results.

199

### 200 **Synthesis, chromatography and mass spectrometry of soluble peptide**

201 The peptide sequence SASDQPTQYEEEMTDYQK, corresponding to residues 290-307  
202 of PvAMA-1 and having the best prediction scores for B cell epitopes and IURs was  
203 manually synthesized by Fmoc chemistry [43]. The peptide was C-terminally amidated.  
204 The peptide was deprotected and released from the resin by TFA treatment in the presence  
205 of the appropriate scavengers. The peptide was lyophilized and its purity and mass  
206 assessed by HPLC and mass spectrometry, respectively.

207 The peptide was purified by high performance liquid chromatography (HPLC) in a C18  
208 reverse phase column (Vydac) (flow rate 1.0 mL/min). The column was previously  
209 equilibrated with 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA), and the compound was eluted  
210 by a linear gradient 0.1% TFA in acetonitrile. Two peaks were obtained (data not shown).

211 The major peak was then submitted to MALDI-TOF-TOF analyses. MS and tandem MS  
212 analysis were performed using a MALDI-TOF-TOF AutoFlex III™ (Bruker Daltonics)  
213 instrument in positive/reflector mode controlled by the FlexControl™ software.  
214 Instrument calibration was achieved by using Peptide Calibration Standard II (Bruker

215 Daltonics) as reference and  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as matrix. The  
216 major peak was spotted to MTP AnchorChip™ 400/384 (Bruker Daltonics) targets using  
217 standard protocols for dried droplet method.

218

### 219 **Antibody measurement**

220 The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for total IgG antibodies was  
221 performed as previously described [39]. The concentrations of antigens used were 1.0  
222  $\mu\text{g/mL}$  (PvAMA-1 and DII) and 2.0  $\mu\text{g/mL}$  (synthetic peptide). All samples were diluted  
223 1:100 and evaluated for total IgG using peroxidase-conjugated anti-human IgG antibodies  
224 (Sigma, St. Louis, MO). The ELISA to detect IgG subclasses was performed as  
225 previously described [44]. The serum dilution used was 1:100 and mouse monoclonal  
226 antibodies to human IgG subclasses used (clone HP-6012 for IgG1, clone HP-6014 for  
227 IgG2, clone HP-6010 for IgG3, and clone HP-6025 for IgG4, all from Sigma, USA) were  
228 diluted according to the manufacturer's specifications. Monoclonal antibody binding was  
229 detected with peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin (Sigma). The threshold  
230 of positivity (cut-off value) was obtained by testing 20 different negative control sera  
231 from individuals not exposed to malaria from Belo Horizonte. The mean optical density  
232 value at 492 nm  $\pm$  3 SD for duplicate determinations in negative sera was used as the cut-  
233 off value for different subclasses. The thresholds of positivity were 0.32 for IgG, 0.15 for  
234 IgG1, 0.13 for IgG2, 0.1 for IgG3, and 0.06 for IgG4. The reactivity index (RI) was  
235 obtained to compare the levels of different subclasses (IgG or IgG isotype) in the same  
236 subject or among distinct groups. The RI value was calculated by dividing the mean OD  
237 value for each test sample assayed by the cut-off value for each subclass tested using sera



238 from healthy individuals (control group). Samples with an RI > 1 were considered  
239 positive.

240

#### 241 **Depletion ELISA**

242 Depletion ELISA was performed as previously described [45]. Briefly, flat-bottom plates  
243 (BD Falcon, USA) were coated overnight with 10 µg/mL of the peptide  
244 SASDQPTQYEEEMTDYQK, then washed, and blocked as described. Sera were added  
245 to the plates in 1:100 dilution and incubated overnight. On the following day, sera were  
246 transferred to plates coated overnight with PvAMA-1 and DII (1 µg/mL) after appropriate  
247 washing and blocking, and ELISA were performed as described.

248

#### 249 **Statistical analysis**

250 The one-sample Kolmogorov-Smirnoff test was used to determine whether variable was  
251 normally distributed. All statistics were carried out using Prism 5.0 for Windows  
252 (GraphPad Software, Inc.). Association between antibody response to PvAMA-1  
253 ectodomain and DII was determined by Fisher's exact test and Spearman rank test. P  
254 values were also determined by two-tailed Mann-Whitney U test. A two-sided P value <  
255 0.05 was considered significant.

256

257 **RESULTS**

258 **Antibodies from naturally *P. vivax* infected individuals present similar pattern of**  
259 **recognition between PvAMA-1 ectodomain and PvAMA-1 domain II**

260 In order to confirm previously published data showing that PvAMA-1 domain II is the  
261 immunodominant region of this protein, the detection of specific antibodies against both  
262 PvAMA-1 ectodomain and DII was evaluated. Natural *P. vivax* infection elicits a  
263 considerable IgG production against both antigens (Figure 1A). Although the levels of  
264 specific IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 to the AMA-1 ectodomain and domain DII varied in  
265 naturally *P. vivax* infected individuals, the predominance of IgG1 and IgG3 antibodies to  
266 PvAMA-1 and DII was observed (Figure 1A).

267 The overall prevalence of donors who presented IgG antibodies to each antigen was  
268 62.4% (Figure 1B), although IgG positive responders to each antigen were not  
269 necessarily the same (data not shown). Nevertheless, the frequency of IgG responders to  
270 ectodomain was significantly associated with the frequency observed of IgG responders  
271 to DII ( $P < 0.0418$ , Fisher's exact test). Analysis of specific IgG subclass production  
272 demonstrated that the association between individuals who responded to DII and those  
273 responders to full length ectodomain was still significant (IgG1,  $P < 0.0001$ ; IgG2,  $P =$   
274  $0.0002$ ; IgG3,  $P < 0.0001$  and IgG4,  $P = 0.0007$ ; Fisher's exact test), confirming that DII  
275 is a highly antigenic region within the PvAMA-1 protein. The strong association of  
276 specific IgG1 and IgG3 responses to ectodomain and DII was further demonstrated by a  
277 direct correlation between reactivity index for PvAMA-1 and reactivity index for Domain  
278 II ( $P < 0.0001$ ,  $r = 0.7971$  for IgG1 and  $< 0.0001$ ,  $r = 0.6499$  for IgG3; Figure 2). Similar

279 significant correlation was detected for IgG2 and IgG4 antibodies, although a minor  
280 relationship between response to AMA-1 and DII was observed (data not shown).

281

282 **Predictions of B-cell linear epitopes and intrinsically unstructured/disordered**  
283 **regions in AMA-1 ectodomain and chemical synthesis of a selected peptide**

284 In order to explain the clear concordance between IgG response to ectodomain and DII,  
285 we scanned the primary sequence of AMA-1 ectodomain for possible B-cell linear  
286 epitopes co-occurring with intrinsically unstructured/disordered regions (IURs) (Figure  
287 3). We observed several predicted epitopes distributed within all three domains of  
288 ectodomain, with no apparent occurrence bias in any domain. Indeed, the three best  
289 predicted epitopes (5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup>) are each distributed in a distinct domain (domains I, II  
290 and III, respectively). The putative IURs identified are also distributed in all three  
291 domains, with a slight preference for occurrence in domain I. Of special interest,  
292 however, was the overlap observed between the putative epitope possessing the highest  
293 prediction score (7<sup>th</sup> epitope, score of 1.234) and the putative second best IUR (4<sup>th</sup> IUR,  
294 score of 0.481), predicted in domain II. The other two best predicted epitopes (5<sup>th</sup> and  
295 10<sup>th</sup>) occur in regions where no IUR were found (5<sup>th</sup>) or in regions where IUR have a low  
296 prediction score (10<sup>th</sup>). Considering the higher prediction scores for both evaluated  
297 features, the peptide SASDQPTQYEEEMTDYQK was selected for further synthesis and  
298 immunological testing.

299 Analytical chromatography of the predicted peptide demonstrated the purity of  
300 80-90% for the synthetic compound (data not shown). Mass spectra analyses also

301 indicated an estimated mass of 2150.017 Da that correspond to the mass of peptide  
302 (Supplementary Figure S1).

303

304 **Synthetic malarial peptide SASDQPTQYEEEMTDYQK is highly recognized by**  
305 **specific antibodies to PvAMA-1 DII**

306 The antigenicity of the synthetic peptide SASDQPTQYEEEMTDYQK was initially  
307 evaluated by the determination of the specific IgG responses using sera from *P. vivax*  
308 infected individuals who were knowingly reactive to PvAMA-1 ectodomain only, to  
309 domain II only, or reactive to both antigens. The data clearly show that the peptide was  
310 recognized by all serum samples that specifically recognized the domain II (Figure 4),  
311 thus confirming the previous prediction of B cell epitopes. When serum from infected  
312 individuals with no reactivity to the DII (reactive only to PvAMA-1) was assayed against  
313 the synthetic peptide, 58.3% of positivity was observed (Figure 4), suggesting the  
314 antibody production to this region in natural infection is present but not sufficient to  
315 detect the domain II. Of note, the highest reactivity indices for the synthetic peptide were  
316 observed in individuals that previously responded to both AMA-1 and domain II (Figure  
317 5). No association between IgG levels against the synthetic peptide and exposure  
318 (determined by number of malaria episodes) was detected (Figure 5).

319 In order to determine the immunodominance of the synthetic peptide  
320 SASDQPTQYEEEMTDYQK within PvAMA-1 and DII antibody responses, an ELISA  
321 depletion assay was performed. In this assay, the IgG reactivity against PvAMA-1 and  
322 DII after depletion of peptide specific antibodies was reduced in 18% ( $P = 0.1882$ ) and  
323 33% ( $P = 0.0254$ ), respectively (Figure 6).

324

## 325 **DISCUSSION**

326           During the last decades the development of subunit malaria vaccines candidates  
327 has been thoroughly pursued [46]. Although malaria vaccine development has been  
328 hastened by description of numerous candidates, no vaccine yet has provided a strong and  
329 lasting immune response [47]. Nonetheless, significant progress has been achieved as  
330 several malarial vaccine are currently undergoing pre-clinical and clinical trials  
331 [11,46,48]. While more than 70 *P. falciparum* vaccine candidates are currently under  
332 development and 23 of these are undergoing clinical testing, only few *P. vivax* vaccine  
333 formulations are being assessed in pre-clinical studies and so far just two candidates (the  
334 CSP and the Pvs25) has been tested in Phase 1 clinical trials (reviewed in [49]). One of  
335 the most promising components for a malaria blood-stage vaccine is the apical membrane  
336 antigen 1 (AMA-1) due to efficacy observed after blood-stage challenge in animal  
337 models [11]. The assessment of protective outcome demonstrated that vaccination with  
338 native [50] or recombinant AMA-1 [10,51] in mice and monkeys conferred protection  
339 from parasite challenge and induce antibodies that inhibit parasite growth in vitro  
340 [17,40,52]. These data have sparked interest toward the further clinical testing in human;  
341 few reports on Phase Ia trials in malaria-naïve subjects are already available for *P.*  
342 *falciparum* AMA-1 [53,54,55] and results from ongoing and planned studies are expected  
343 in the near future for vivax malaria [17]. While the success of this vaccine will be  
344 determined in field trials under natural conditions of parasite exposure, the continuous  
345 improvement of malaria vaccine design is still required. For instance, thus far, no  
346 recombinant malarial protein-in-adjuvant formulations have proved sufficiently

347 efficacious to encourage further testing [56,57]. Moreover, the production of high-quality  
348 and correctly folded recombinant proteins is difficult for *Plasmodium* [58].

349 In the present study, our focus has been to characterize naturally antigenic B-cell  
350 determinants of the AMA-1 vaccine antigen, in order to attempt the selection of future  
351 potential malarial subunit vaccines by using bioinformatics tools and synthetic peptide  
352 technology. We initially confirmed that serum from naturally infected individuals used to  
353 further characterization of B cell epitopes were highly reactive to the recombinant AMA-  
354 1 of *P. vivax*, where more than 60% of specific IgG recognition were detected among  
355 individuals with patent vivax malaria. In fact, immunoepidemiological studies have  
356 shown that specific antibody responses to AMA-1 are highly prevalent in naturally  
357 exposed individuals to malaria, even with distinct degrees of parasite exposure  
358 [14,16,39]. However, it is important to mention that due to the considerable homology of  
359 AMA-1 sequence among *Plasmodium* species [59], cross-reactive responses are expected  
360 to occur since *P. falciparum* is still responsible for 16.3% of registered malaria cases in  
361 Brazil [60]. We also demonstrated a similar proportion of IgG response between AMA-1  
362 and domain II (DII) during natural infection, which corroborates a previous report  
363 showing that DII is a particularly antigenic and immunogenic region within AMA-1 [37].  
364 Furthermore, the analysis of IgG subclass indicated a predominant IgG1 and IgG3  
365 antibody production against both AMA-1 and domain II. Of note, IgG1 and IgG3  
366 antibodies have been implicated in antibody-mediated protective immunity against  
367 malaria [61]. While the pattern of IgG subclass against the recombinant AMA-1 has been  
368 clearly characterized in natural infection [14,17], we first demonstrated the prevalence of  
369 IgG isotypes specific to domain II in patent infected individuals. Noteworthy, equivalent

370 IgG subclass recognition between DII and the full ectodomain was also observed during  
371 natural infection. Interestingly, our analysis demonstrated that IgG and IgG subclass  
372 elicited against AMA-1 are significantly associated with antibody production against DII.

373 Current understanding of AMA1 immunity suggests that direct action of antibody  
374 is the primary protective mechanism [17]. Selection of parasitic epitopes that elicit  
375 protective antibodies after immunization would render a strategic approach in the design  
376 of effective vaccines. The recent availability of genomic [62,63], proteomic [64] and  
377 transcriptomic [64,65] data sets for *Plasmodium* species and the development of  
378 algorithms for B cell epitope prediction [41,66] have facilitated the identification of  
379 promising vaccine antigens [67] and immunodominant regions within selected  
380 candidates. In the current study, we analyzed the primary sequence of PvAMA-1 for  
381 possible B cell linear epitopes co-occurring with intrinsically unstructured/disordered  
382 regions (IURs). Determinants containing both B cell linear epitopes and IURs are more  
383 likely to represent a real antigenic/immunogenic region within a protein. Indeed, the co-  
384 occurrence of IURs and linear epitopes increase the odds that the epitope is present in  
385 regions with no secondary structure (extended regions) that, therefore, are more likely to  
386 be exposed in the surface of the protein [68]. Our results showed that prediction of B cell  
387 epitopes have identified antigenic regions distributed all over the three distinct domains,  
388 which might represent promising polypeptidic vaccine candidates. Considering the high  
389 degree of amino acid sequence conservation in the domain II loop in both *P. falciparum*  
390 and *P. vivax* AMA-1 [33,34,35], the strong association between AMA-1 and domain II  
391 antibody responses, and the epitope with highest prediction scores for both analyzed  
392 features found in domain II, we have selected the peptide SASDQPTQYEEEMTDYQK

393 for further chemical synthesis and immunological testing. Moreover, the analysis of this  
394 specific immunodominant region did not present homology with any genome sequence of  
395 mice and humans (data not shown), strengthening the rationale for its possible future use  
396 in pre-clinical and clinical trials.

397         Analysis of antigenicity of the selected peptide using serum from naturally *P.*  
398 *vivax* infected individuals who were previously reactive to PvAMA-1 only, to DII only or  
399 to both recombinant proteins, demonstrated that SASDQPTQYEEEMTDYQK peptide  
400 was recognized by all serum samples that also specifically recognized the domain II.  
401 Moreover, serum from infected individuals with no reactivity to the domain II presented a  
402 considerable positivity (58.3%) against the synthetic peptide, suggesting that during  
403 natural infection there is a specific antibody production against this antigenic epitope,  
404 which is probably not detectable when serum is assayed only against the DII.  
405 Interestingly, although the number of malaria episodes has been associated with  
406 frequency of antibody response to PvAMA-1 in naturally infected individuals [39], our  
407 results did not show a clear association between IgG antibody recognition to the synthetic  
408 peptide and previous exposure to malaria. Finally, results from antibody depletion assay  
409 indicated that specific antibodies to the synthetic peptide would account for up to 18%  
410 and 33% of PvAMA-1 and domain II antibodies responses, respectively. Overall, these  
411 results suggest that this linear epitope is highly antigenic during natural human infections  
412 and it is an important antigenic region of the domain II of PvAMA-1. Although  
413 antibodies are widely agreed to play a role in protection against blood-stage malaria [56],  
414 the real contribution of the antibody response against this polypeptide remains to be  
415 addressed. Of note, a previous study establishing the epitope recognition by the invasion-



416 inhibitory monoclonal antibody 4G2 specific for *P. falciparum* AMA-1 has demonstrated  
417 not only the importance of conformational epitopes but also of a singular disordered  
418 region with no electron density between residues 348 and 389 (equivalent to residues 293  
419 to 334 in PvAMA-1) in the parasite invasion [69].

420 In summary, in the current study we have identified a highly antigenic B cell  
421 epitope within the PvAMA-1 vaccine candidate and its serological reactivity during  
422 natural infection. Selection of particular antigenic and immunogenic epitopes within  
423 AMA-1 antigen would represent an interesting perspective to overcome the hurdles  
424 observed in vaccine development, mainly the production of high-quality and correctly  
425 folded proteins in heterologous expression, as smaller antigenic polypeptide can facilitate  
426 a large-scale production and generation of chimeric peptide containing multiple relevant  
427 epitopes of malarial antigens. Pre-clinical studies are currently underway to determine  
428 whether the immunization with this peptide would elicit a strong and lasting  
429 immunogenicity in mice as already demonstrated for the recombinant domain II [70].

430

431

## 432 **ACKNOWLEDGEMENT**

433

434 This work was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do  
435 Estado de Minas Gerais/FAPEMIG (Grant # CBB APQ-0997-4.01/07). Lilian Bueno is  
436 supported by a Doctoral degree fellowship from CNPq/Brazil. Francisco Lobo is  
437 supported by a Post-doctoral fellowship from PNPd/CAPES. Irene Soares, Daniella  
438 Bartholomeu, Marcus Vinícius Lacerda, Carlos Chavez Olórtegui, Ricardo Fujiwara and  
439 Érika Braga are supported by Brazilian National Research Council (CNPq) fellowships.

440 We thank the Núcleo de Estudo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento  
441 de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de  
442 Minas Gerais Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) to the support for mass spectrometry.

443

444

445 **REFERENCES**

446

447 1. Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, et al. (2011) A research  
448 agenda to underpin malaria eradication. PLoS medicine 8: e1000406.

449 2. Richie TL, Saul A (2002) Progress and challenges for malaria vaccines. Nature 415:  
450 694-701.

451 3. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN (2009) The pathophysiology of vivax  
452 malaria. Trends Parasitol 25: 220-227.

453 4. Tan LK, Yacoub S, Scott S, Bhagani S, Jacobs M (2008) Acute lung injury and other  
454 serious complications of Plasmodium vivax malaria. Lancet Infect Dis 8: 449-  
455 454.

456 5. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, et al. (2007) Vivax malaria:  
457 neglected and not benign. Am J Trop Med Hyg 77: 79-87.

458 6. Baird JK (2004) Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. Antimicrob Agents  
459 Chemother 48: 4075-4083.

460 7. Arias AE, Corredor A (1989) Low response of Colombian strains of Plasmodium vivax  
461 to classical antimalarial therapy. Trop Med Parasitol 40: 21-23.

462 8. Good MF (2005) Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for  
463 novel strategies. Trends Parasitol 21: 29-34.

- 464 9. Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, Saul A, Long CA, et al. (2002) Vaccination  
465 of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1  
466 confers protection against blood-stage malaria. *Infect Immun* 70: 6961-6967.
- 467 10. Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, et al. (1998)  
468 Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with  
469 *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 16: 240-247.
- 470 11. Herrera S, Corradin G, Arevalo-Herrera M (2007) An update on the search for a  
471 *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol* 23: 122-128.
- 472 12. Vekemans J, Ballou WR (2008) *Plasmodium falciparum* malaria vaccines in  
473 development. *Expert Rev Vaccines* 7: 223-240.
- 474 13. Mahanty S, Saul A, Miller LH (2003) Progress in the development of recombinant  
475 and synthetic blood-stage malaria vaccines. *J Exp Biol* 206: 3781-3788.
- 476 14. Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, et al. (2006) Antibodies  
477 to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with  
478 malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* 75: 582-587.
- 479 15. Udhayakumar V, Kariuki S, Kolczack M, Girma M, Roberts JM, et al. (2001)  
480 Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum*  
481 apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western  
482 Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *Am J Trop Med Hyg* 65: 100-107.

- 483 16. Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Gonçalves A, Rosário VE, et al. (1994) High  
484 prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton  
485 apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme linked  
486 immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1.  
487 Am J Trop Med Hyg 51: 730-740.
- 488 17. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW (2008) Apical membrane antigen  
489 1: a malaria vaccine candidate in review. Trends Parasitol 24: 74-84.
- 490 18. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF (2001) Specificity of the protective antibody  
491 response to apical membrane antigen 1. Infect Immun 69: 3286-3294.
- 492 19. Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, et al. (1989) Integral  
493 membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. Mol  
494 Cell Biol 9: 3151-3154.
- 495 20. Narum DL, Thomas AW (1994) Differential localization of full-length and processed  
496 forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum*  
497 merozoites. Mol Biochem Parasitol 67: 59-68.
- 498 21. Howell SA, Well I, Fleck SL, Kettleborough C, Collins CR, et al. (2003) A single  
499 malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins  
500 by juxtamembrane cleavage. J Biol Chem 278: 23890-23898.
- 501 22. Howell SA, Withers-Martinez C, Kocken CH, Thomas AW, Blackman MJ (2001)  
502 Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical  
503 membrane antigen-1. J Biol Chem 276: 31311-31320.

- 504 23. Donahue CG, Carruthers VB, Gilk SD, Ward GE (2000) The *Toxoplasma* homolog of  
505 *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein  
506 secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Mol Biochem*  
507 *Parasitol* 111: 15-30.
- 508 24. Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FF, de Vries E (2004) Erythrocyte invasion by  
509 *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against  
510 peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane  
511 antigen 1. *Infect Immun* 72: 2947-2955.
- 512 25. Waters AP, Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Hudson DE, et al. (1990) A  
513 merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and  
514 distributed throughout *Plasmodium*. *J Biol Chem* 265: 17974-17979.
- 515 26. Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME, Bradley PJ, Dubremetz JF, et al. (2000) *Toxoplasma*  
516 *gondii* homologue of *plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in  
517 invasion of host cells. *Infect Immun* 68: 7078-7086.
- 518 27. Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, et al. (2000) Apical  
519 membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium*  
520 species. *Mol Microbiol* 38: 706-718.
- 521 28. Li F, Dluzewski A, Coley AM, Thomas A, Tilley L, et al. (2002) Phage-displayed  
522 peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the  
523 merozoite invasion of host erythrocytes. *J Biol Chem* 277: 50303-50310.

- 524 29. Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH (2004) Apical  
525 membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close  
526 attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun* 72: 154-  
527 158.
- 528 30. Fraser TS, Kappe SH, Narum DL, VanBuskirk KM, Adams JH (2001) Erythrocyte-  
529 binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on  
530 the surface of transfected COS-7 cells. *Mol Biochem Parasitol* 117: 49-59.
- 531 31. Kato K, Mayer DC, Singh S, Reid M, Miller LH (2005) Domain III of *Plasmodium*  
532 *falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein  
533 Kx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5552-5557.
- 534 32. Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, et al. (2004) A role for apical  
535 membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum*  
536 sporozoites. *J Biol Chem* 279: 9490-9496.
- 537 33. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Grynberg P, Cui L, Hughes AL (2009) Nucleotide  
538 sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals  
539 population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Infect Genet Evol* 9: 1295-  
540 1300.
- 541 34. Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE, Ganguli I, Perera L, et al. (2007)  
542 Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane  
543 antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol* 24: 939-  
544 947.

- 545 35. Chesne-Seck ML, Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Collins CR, Blackman MJ, et  
546 al. (2005) Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and  
547 paralogues in apicomplexan parasites. *Mol Biochem Parasitol* 144: 55-67.
- 548 36. Lalitha PV, Ware LA, Barbosa A, Dutta S, Moch JK, et al. (2004) Production of the  
549 subdomains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1  
550 ectodomain and analysis of the immune response. *Infect Immun* 72: 4464-4470.
- 551 37. Mufalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FT, Rodrigues MM, et al. (2008)  
552 *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of  
553 different domains by antibodies induced during natural human infection.  
554 *Microbes Infect* 10: 1266-1273.
- 555 38. Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, et al. (1997) Identification of  
556 the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant  
557 sequences in the small subunit rRNA gene  
558 . *Parasitology International* 46: 91-95.
- 559 39. Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo AN, Rodrigues MM, et al.  
560 (2005) Antibody response of naturally infected individuals to recombinant  
561 *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol* 35: 185-192.
- 562 40. Kocken CH, Dubbeld MA, Van Der Wel A, Pronk JT, Waters AP, et al. (1999) High-  
563 level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in  
564 *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with P.  
565 *vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect Immun* 67: 43-49.



- 566 41. Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell  
567 epitopes. *Immunome Res* 2: 2.
- 568 42. Dosztanyi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I (2005) IUPred: web server for the  
569 prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated  
570 energy content. *Bioinformatics* 21: 3433-3434.
- 571 43. Gausepohl H, Boulin C, Kraft M, Frank RW (1992) Automated multiple peptide  
572 synthesis. *Pept Res* 5: 315-320.
- 573 44. Morais CG (2005) Resposta humoral de isotipos de IgG às proteínas MSP-1<sub>19</sub> e  
574 AMA-1 de *Plasmodium vivax* em indivíduos expostos a diferentes situações de  
575 transmissão de malária no Brasil. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas  
576 Gerais. 102 p.
- 577 45. Santiago HC, Bennuru S, Boyd A, Eberhard M, Nutman TB (2011) Structural and  
578 immunologic cross-reactivity among filarial and mite tropomyosin: implications  
579 for the hygiene hypothesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127:  
580 479-486.
- 581 46. Moorthy VS, Good MF, Hill AV (2004) Malaria vaccine developments. *Lancet* 363:  
582 150-156.
- 583 47. Wykes M, Good MF (2007) A case for whole-parasite malaria vaccines. *Int J*  
584 *Parasitol* 37: 705-712.

- 585 48. Webster D, Hill AV (2003) Progress with new malaria vaccines. Bull World Health  
586 Organ 81: 902-909.
- 587 49. Arevalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S (2010) Current status of Plasmodium vivax  
588 vaccine. Human vaccines 6: 124-132.
- 589 50. Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, et al. (1988) Vaccination  
590 trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD  
591 merozoite antigen. Parasite Immunol 10: 535-552.
- 592 51. Collins WE, Pye D, Crewther PE, Vandenberg KL, Galland GG, et al. (1994)  
593 Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical  
594 membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. Am J Trop Med Hyg 51: 711-719.
- 595 52. Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, Holder AA (2000) Immunization with parasite-  
596 derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific  
597 monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal Plasmodium yoelii  
598 yoelii YM blood-stage infection. Infect Immun 68: 2899-2906.
- 599 53. Saul A, Lawrence G, Allworth A, Elliott S, Anderson K, et al. (2005) A human phase  
600 1 vaccine clinical trial of the Plasmodium falciparum malaria vaccine candidate  
601 apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. Vaccine 23: 3076-  
602 3083.
- 603 54. Ockenhouse CF, Sun PF, Lanar DE, Welde BT, Hall BT, et al. (1998) Phase I/IIa  
604 safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored,

605 multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J*  
606 *Infect Dis* 177: 1664-1673.

607 55. Malkin EM, Diemert DJ, McArthur JH, Perreault JR, Miles AP, et al. (2005) Phase 1  
608 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for  
609 *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 73: 3677-3685.

610 56. Good MF, Doolan DL (2010) Malaria vaccine design: immunological considerations.  
611 *Immunity* 33: 555-566.

612 57. Richards JS, Beeson JG (2009) The future for blood-stage vaccines against malaria.  
613 *Immunol Cell Biol* 87: 377-390.

614 58. Angov E, Hillier CJ, Kincaid RL, Lyon JA (2008) Heterologous protein expression is  
615 enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with  
616 those of the expression host. *PLoS One* 3: e2189.

617 59. Feng ZP, Keizer DW, Stevenson RA, Yao S, Babon JJ, et al. (2005) Structure and  
618 inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein,  
619 apical membrane antigen 1. *J Mol Biol* 350: 641-656.

620 60. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, et al. (2010)  
621 Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115.

622 61. Druilhe P, Khusmith S (1987) Epidemiological correlation between levels of  
623 antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and  
624 malaria-immune status. *Infect Immun* 55: 888-891.

- 625 62. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, et al. (2008) Comparative  
626 genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455:  
627 757-763.
- 628 63. Pain A, Hertz-Fowler C (2009) *Plasmodium* genomics: latest milestone. *Nat Rev*  
629 *Microbiol* 7: 180-181.
- 630 64. Wastling JM, Xia D, Sohal A, Chaussepied M, Pain A, et al. (2009) Proteomes and  
631 transcriptomes of the Apicomplexa--where's the message? *Int J Parasitol* 39: 135-  
632 143.
- 633 65. Bozdech Z, Mok S, Hu G, Imwong M, Jaidee A, et al. (2008) The transcriptome of  
634 *Plasmodium vivax* reveals divergence and diversity of transcriptional regulation  
635 in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16290-16295.
- 636 66. Blythe MJ, Flower DR (2005) Benchmarking B cell epitope prediction:  
637 underperformance of existing methods. *Protein Sci* 14: 246-248.
- 638 67. Doolan DL (2010) *Plasmodium* immunomics. *Int J Parasitol* 41: 3-20.
- 639 68. List C, Qi W, Maag E, Gottstein B, Muller N, et al. (2010) Serodiagnosis of  
640 *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by  
641 peptide microarray. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e771.
- 642 69. Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez  
643 C, et al. (2005) Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical  
644 membrane antigen 1. *Science* 308: 408-411.

645 70. Gentil F, Bargieri DY, Leite JA, Francoso KS, Patricio MB, et al. (2010) A  
646 recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane  
647 Antigen 1 induces high antibody titres in mice. Vaccine 28: 6183-6190.

648

649

650

651

652

653

#### 654 **FIGURE LEGENDS**

655

656 Figure 1 – Levels and proportion of specific IgG and IgG subclass antibodies to PvAMA-  
657 1 ectodomain and PvAMA-1 Domain II (DII). (A) Y axis represent the mean  
658 reactivity index in naturally *P. vivax* infected individuals. Dotted line shows the  
659 threshold of positivity (reactivity index = 1). (B) Y axis represent the mean  
660 prevalence of positivity observed in naturally *P. vivax* infected individuals. Serum  
661 samples (n = 214) were tested at dilution 1:100.

662

663 Figure 2 – Specific antibodies to PvAMA-1 are directly correlated with antibody  
664 responses to Domain II. Correlation of PvAMA-1 reactivity index and Domain II  
665 reactivity index for (A) IgG1 and (B) IgG3 among 214 patients with *Plasmodium*  
666 *vivax* malaria was determined by Spearman rank correlation.

667

668 Figure 3 – Schematic diagram of the structure of PvAMA-1 and the prediction scores for  
669 linear B cell epitopes and intrinsically unstructured/disordered regions (IURs).  
670 The region corresponding to the residues 290-307 of Pv-AMA-1 was selected for  
671 synthesis of soluble peptide based on the best prediction scores determined for  
672 both features. Each green bar represents a predicted B cell epitope and each red  
673 bar represents a predicted unordered region. The prediction scores represent the  
674 average of scores for all amino acids within the region with prediction values  
675 above the cutoffs chosen for significance. Bar color intensity are proportional to  
676 the prediction scores found.

677 Figure 4 – Specific IgG levels to synthetic peptide SASDQPTQYEEEMTDYQK. Serum  
678 samples were selected from naturally *P. vivax* infected individuals who presented  
679 previous reactivity to PvAMA-1 ectodomain only, to PvAMA-1 Domain II (DII)  
680 only or to both antigens. Antibody responses are expressed as reactivity index  
681 detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The horizontal dotted line  
682 shows the threshold of positivity at a reactivity index of 1. Percentage values  
683 represent the overall frequency of positive responders for each group.

684

685 Figure 5 – IgG antibody recognition of synthetic peptide in naturally *P. vivax* infected  
686 individuals with known reactivity to PvAMA-1 ectodomain only, to PvAMA-1  
687 Domain II (DII) only or to both antigens. Ages (years) and number of malaria  
688 episodes are indicated for each individual. Different levels of IgG antibody  
689 production (reactivity index) are represented with different shading patterns.

690

691 Figure 6 – Immunodepletion results showing specific IgG antibody recognition to  
692 synthetic peptide in naturally *P. vivax* infected individuals with known reactivity  
693 to PvAMA-1 and Domain II (DII). The sera were depleted with synthetic peptide  
694 SASDQPTQYEEEMTDYQK and further evaluated against PvAMA-1 and DII.  
695 The mean antibody OD values (n = 11) are shown on Y-axis and error bars  
696 indicate the SD. Statistical differences were detected using Mann-Whitney U test  
697 and are indicated on the graphs with significant P values.

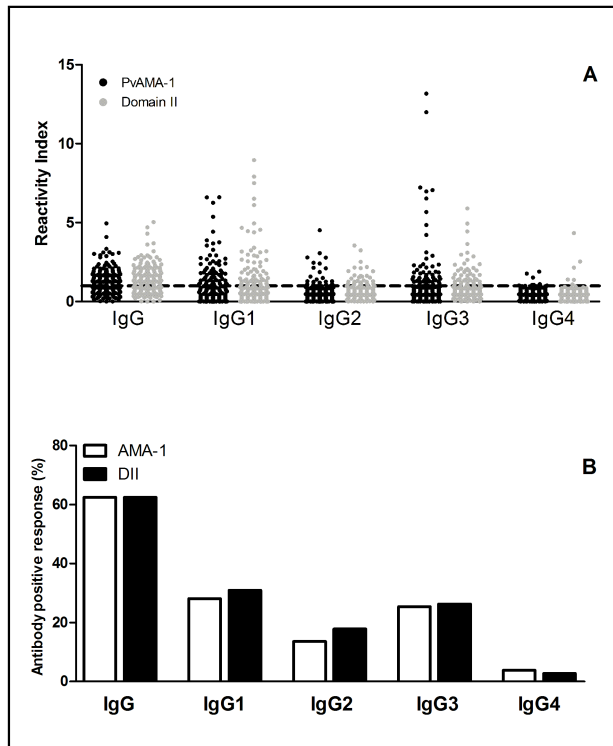
698

699

700 Supplementary Figure S1 – MALDI-TOF-TOF analysis of synthetic peptide  
701 SASDQPTQYEEEMTDYQK.

702

703 Figure 1



704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

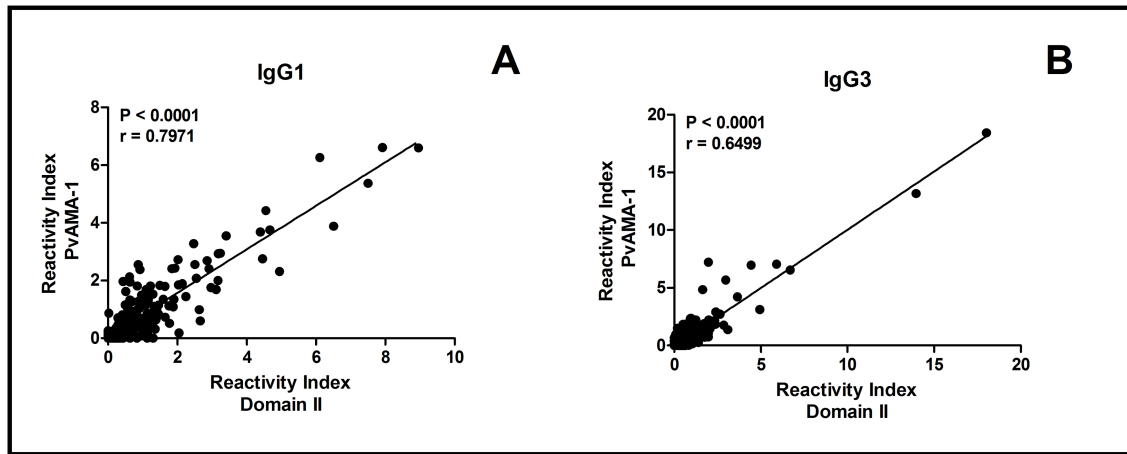
714

715

716



717 Figure 2



718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

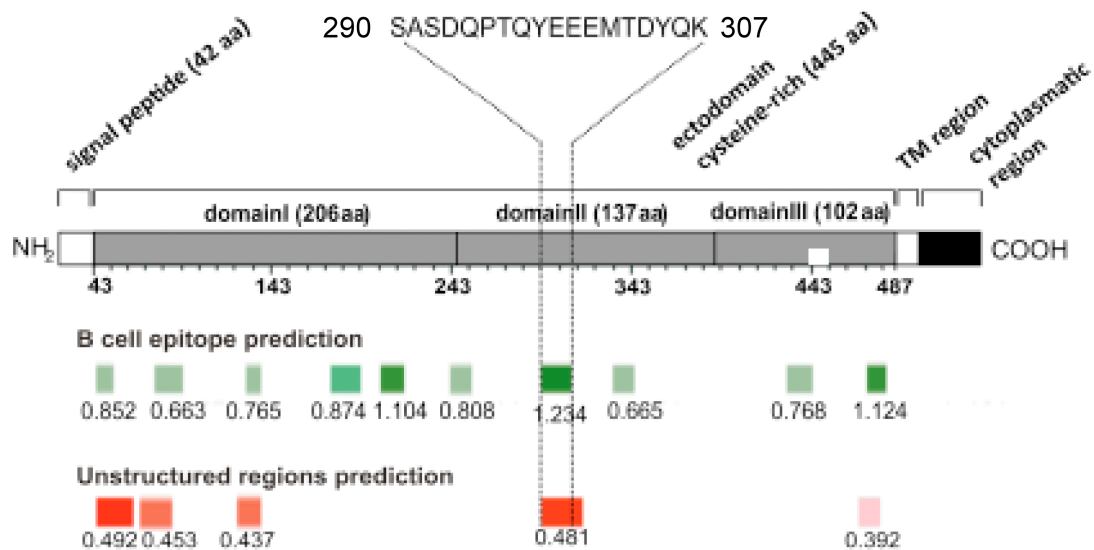
730

731

732

733

734 Figure 3



735

736

737

738

739

740

741

742

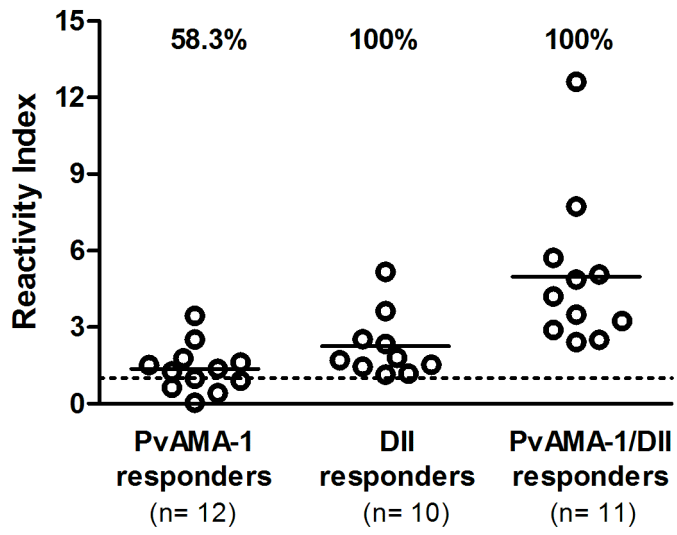
743

744

745

746

747 Figure 4



748

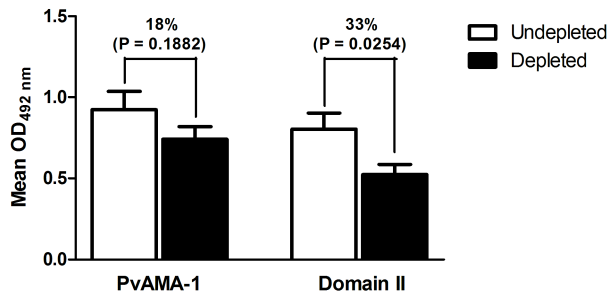
749

750 Figure 5

	ID	Age	Number of malaria episodes	IgG Levels against synthetic peptide
Reactive to PvAMA-1 only	#1	21	1	
	#2	44	4	
	#3	24	1	
	#4	27	4	
	#5	41	2	
	#6	29	3	
	#7	28	2	
	#8	56	5	
	#9	48	2	
	#10	18	3	
	#11	18	3	
	#12	15	1	
Reactive to Domain II only	#13	44	5	
	#14	67	3	
	#15	19	10	
	#16	57	6	
	#17	68	5	
	#18	29	2	
	#19	14	2	
	#20	37	2	
	#21	59	2	
	#22	21	2	
Reactive to PvAMA-1 and Domain II	#23	64	11	
	#24	33	6	
	#25	48	9	
	#26	48	2	
	#27	52	2	
	#28	64	5	
	#29	21	1	
	#30	21	1	
	#31	54	4	
	#32	25	5	
	#33	27	2	

	< 1	ELISA Reactivity Index
	1 - 4	
	> 4	

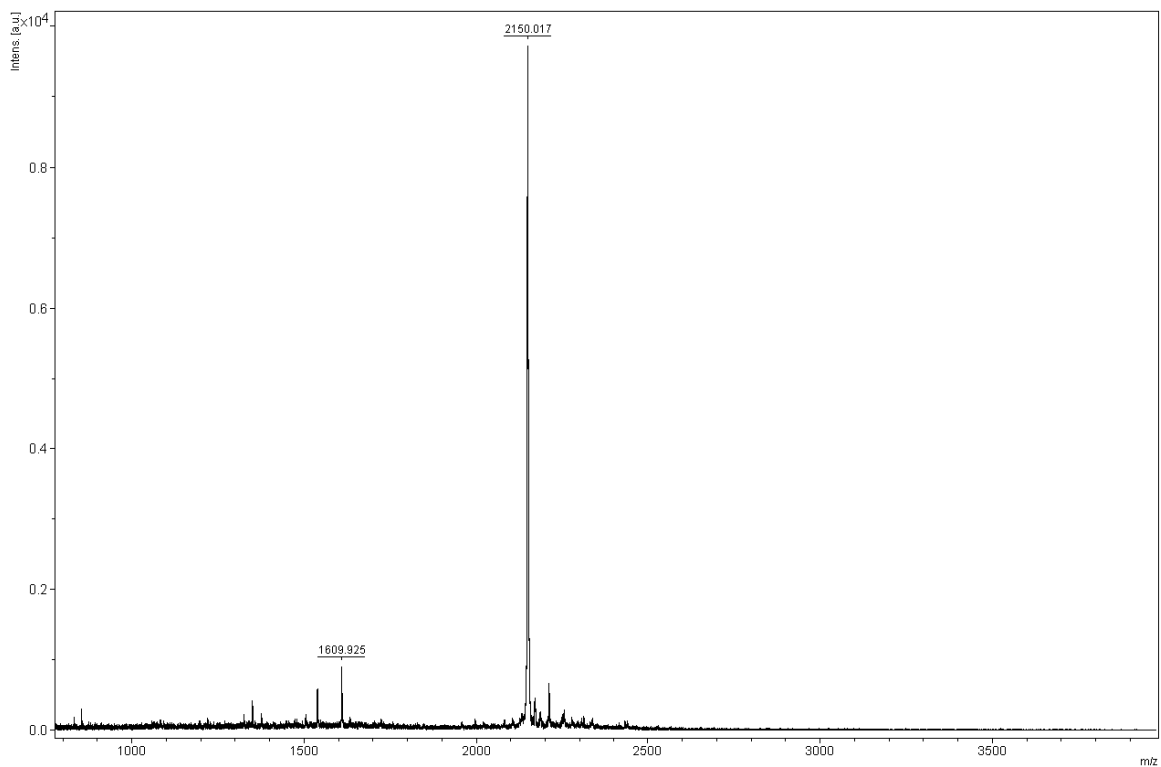
752 Figure 6



753

754

755 Supplementary Figure S1



756

## 6. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A malária é a doença parasitária de maior importância global, afetando de 200 a 600 milhões de pessoas anualmente (Snow et al., 2005). Ao longo de décadas, um grande esforço tem sido feito na tentativa de controlar a infecção e, apesar disso, essa doença continua matando cerca de um milhão de crianças a cada ano (WHO, 2008). Das cinco espécies de *Plasmodium* (Cox-Singh et al., 2008) que podem acometer o homem, o *P. falciparum* é responsável pela maioria das mortes causadas pela infecção malárica, e por essa razão essa espécie foi foco principal de pesquisas ao longo dos últimos anos, concentrando a maior quantidade de recursos investidos. Por outro lado, a malária vivax tem sido negligenciada (Baird, 2007) por apresentar índices menores de mortalidade. Entretanto, é importante ressaltar que o número de pessoas vivendo sob o risco de contrair o *P. falciparum* ou o *P. vivax* é aproximado, representando 2,5 e 2,6 bilhões de pessoas, respectivamente (Guerra et al., 2006). Além disso, o verdadeiro número de infecções anuais pelo *P. vivax*, ao contrário do sempre citado de 70 a 80 milhões, seria da ordem de 130 a 390 milhões (Hay et al., 2004). E mesmo considerando a menor das estimativas, o número de infecções por *P. vivax* seria igual ao da dengue e cinco vezes maior que o descrito para a febre tifóide (Baird, 2007).

A infecção por *P. vivax* foi considerada benigna por muitos anos, uma vez que raramente estava associada à malária grave (Galinski et al., 2008). Recentemente, esse panorama vem se modificando, e diversos estudos têm descrito diferentes aspectos associados à gravidade durante a monoinfecção por essa espécie (Tijtra et al., 2008; Price et al., 2009; Putaporntip et al., 2009), como anemia grave, agregação de plaquetas, citoaderência no pulmão e trombocitopenia (Mendis et al., 2001; Cui et al., 2003; Barcus et al., 2007; Genton et al., 2008; Tijtra et al., 2008; Carvalho et al., 2010). Importa ressaltar que, como observado para o *P. falciparum*, a resistência do *P. vivax* aos quimioterápicos convencionais tem emergido nos últimos anos, sendo a resistência à cloroquina já reportada na Indonésia, Mianmar, Índia, Austrália, Guiana e América do Sul (Baird, 2004).

Vários fatores têm contribuído para a escassez de pesquisas em malária vivax como, por exemplo, uma subestimada prevalência mundial, uma percepção errada de que o *P. vivax* não levaria às mesmas complicações relatadas em infecções por *P. falciparum*, além da dificuldade de se manter culturas do parasito *in vitro*, restrita a poucos laboratórios (Golenda *et al.*, 1997; Galinski *et al.*, 2008). Considerando também que o *P. vivax* é a espécie prevalente no Brasil (80% das infecções notificadas), esses fatores reforçaram a necessidade de focar nossos estudos nesta espécie.

Uma resposta imune protetora contra a malária é iniciada pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas), que por fim ativarão células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A proteção contra a infecção resultante da resposta imune do tipo Th1 é largamente mediada pela citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2002). Essas citocinas agem sinergicamente, otimizando a produção de reativos de oxigênio e nitrogênio, que estão associados com a morte do parasito (Jacobs *et al.*, 1996b). Em paradoxo, a gravidade da infecção por *Plasmodium* está associada a uma resposta inflamatória iniciada contra a fase sanguínea do parasito (Schofield *et al.*, 2005). Um balanço delicado entre a resposta imunológica pró e anti-inflamatória é necessário para que ocorra a destruição do parasito sem que se desencadeie no hospedeiro a malária grave, sugerindo que o tempo e a intensidade da resposta sejam cruciais na determinação do resultado da infecção (Good *et al.*, 2005; Riley *et al.*, 2006; Langhorne *et al.*, 2008).

Os mecanismos imunorregulatórios podem prevenir danos mais intensos aos órgãos, desde que a parasitemia seja controlada pela resposta inflamatória efetora. Essa regulação também poderia causar a supressão de células T tanto para antígenos de malária quanto para antígenos não relacionados, o que é frequentemente observado em populações expostas ao *Plasmodium* (Greenwood *et al.*, 1972; Goonewardene *et al.*, 1990; Braga *et al.*, 2002b). O entendimento do processo de desenvolvimento da imunorregulação e imunopatologia na malária permanece incompleto, principalmente nas infecções por *P. vivax*. As células dendríticas, células T reguladoras, e a própria produção de citocinas imunossupressoras podem ter papel fundamental nessa regulação da resposta imune pró-inflamatória exacerbada que



ocorre em indivíduos que desenvolvem malária grave (Riley *et al.*, 2006; Bejon *et al.*, 2007; Wykes *et al.*, 2007a; Walther *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2010).

As células dendríticas iniciam a resposta imune promovendo o estímulo de células T e B. Além disso, apresentam papel essencial na ligação da resposta imune inata e adaptativa. Estudos controversos realizados em modelos murinos e humanos demonstraram que a função das células dendríticas pode ser modulada por eritrócitos parasitados, incluindo inibição da diferenciação de células dendríticas, e também impedindo a ativação de células T (Jacobs *et al.*, 1996a; Urban *et al.*, 2001a; Ocana-Morgner *et al.*, 2003; Pouniotis *et al.*, 2005; Ing *et al.*, 2006; Wykes *et al.*, 2007b; Bousheri *et al.*, 2008; Wykes *et al.*, 2008). Na primeira parte do nosso trabalho (Bueno *et al.*, 2009), demonstramos que indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax* apresentaram uma modulação negativa de moléculas apresentadoras de antígenos (CD1a, HLA-DR e HLA-ABC), moléculas acessórias (CD80, CD86 e CD40), e também do receptor de imunoglobulina Fc $\gamma$ RI (CD64). Essa modulação pode estar diretamente relacionada com a presença do eritrócito infectado (Urban *et al.*, 1999; Urban *et al.*, 2001a; Ocana-Morgner *et al.*, 2003), ou ainda com produtos derivados do parasito, como a hemozoína e os ácidos nucleicos (Braga *et al.*, 2002b; Skorokhod *et al.*, 2004; Parroche *et al.*, 2007).

Ao contrário do descrito para *P. falciparum*, em que o cultivo *in vitro* do parasito já se apresenta bem estabelecido, nenhuma conclusão específica sobre os fatores ou moléculas de *P. vivax* responsáveis por desencadear esse estado de modulação das células dendríticas pode ser definido. Novos estudos são necessários para determinar o papel dessas células na malária vivax. Além disso, foi demonstrado para outras espécies de *Plasmodium* que o estímulo excessivo de células dendríticas, em consequência da alta parasitemia, levaria essas células a um estado não-funcional que poderia ser mediado via TNF- $\alpha$ , hemozoína, ou ainda à resistência a sinalização dos receptores do tipo Toll (Perry *et al.*, 2005; Millington *et al.*, 2006; Franklin *et al.*, 2007). Embora essa inibição das células dendríticas derivadas de monócitos possa não necessariamente reproduzir o real efeito da infecção durante a infecção por *P. vivax*, ela poderia explicar parcialmente o efeito da diminuição do número dessas células (células dendríticas plasmocitóides e mielóides) entre os indivíduos infectados por

*P. vivax* na Tailândia (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008) e também por crianças infectadas por *P. falciparum* no Quênia (Urban *et al.*, 2006). Importa ressaltar que, em estudo realizado recentemente no Brasil em indivíduos naturalmente infectados com malária vivax, foi observado um aumento na proporção de células dendríticas plasmocitóides (CD123<sup>+</sup>) e uma diminuição na relação de células mielóides/plasmocitóides (Goncalves *et al.*, 2010).

A implicação de se observar a modulação de células apresentadoras de antígenos profissionais, como as células dendríticas, em indivíduos naturalmente infectados, é bastante crítica, uma vez que essas podem interferir no sucesso de uma vacina. Em vista disso, é essencial o entendimento do efeito causado pelo parasito nessas células na iniciação da resposta imune, e também o seu impacto na vacinação em áreas endêmicas. Neste trabalho foi observado que a diferenciação de células dendríticas de pacientes infectados, na presença do antígeno Pv-AMA-1, resultou em um aumento da expressão das moléculas apresentadoras de antígeno CD1a e HLA-DR. Esse resultado corrobora a observação prévia de que a diferenciação dessas células na presença desse antígeno de *P. vivax* resulta em uma ativação funcional, e não em uma supressão da função dessas células (Bueno *et al.*, 2008). Esse aumento da expressão desses marcadores na superfície de células dendríticas, após ativação por Pv-AMA-1, poderia estar associado ao processamento e apresentação de antígeno. De fato, demonstramos que peptídeos de Pv-AMA-1, como resultado do processamento pela DCs, eram também reconhecidos na superfície dessas células por anticorpos policlonais específicos. Portanto, a ativação de células dendríticas por Pv-AMA-1 pode potencialmente aumentar a habilidade dessas células em processar e apresentar antígenos, sugerindo que a vacinação de indivíduos naturalmente infectados pode reverter parcialmente a supressão das células dendríticas nesses indivíduos. Interessa ressaltar que, ao realizar os mesmos experimentos com o antígeno MSP-1<sub>19</sub>, não foi observada nenhuma alteração das moléculas de superfície avaliadas neste estudo, o que sugere que o antígeno Pv-AMA-1 poderia induzir um mecanismo específico de imunogenicidade.

Deve-se ressaltar que, após estímulo de PBMCs de indivíduos naturalmente infectados com Pv-AMA-1, foi observado um aumento na produção de citocinas pró-

inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p40), que são associadas à proteção contra a fase sanguínea da infecção (Shear *et al.*, 1989; Stevenson *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1996b). De fato, em alguns estudos, foi observado um reconhecimento dessa proteína em PBMCs de indivíduos longamente expostos ao *P. falciparum*, demonstrando a presença mais robusta, mas curta, da resposta de células T de memória (Lal *et al.*, 1996; Udhayakumar *et al.*, 2001). Finalmente, como já descrito por vários autores, a produção de citocinas inflamatórias pode ser consequência da ativação de células dendríticas, durante a malária, após contato com produtos do parasito (Jacobs *et al.*, 1996b; Bruna-Romero *et al.*, 2001; Pichyangkul *et al.*, 2004; McCall *et al.*, 2007). Importa ressaltar, embora ainda controverso, que as células dendríticas maduras, mesmo apresentando modulação de algumas moléculas essenciais para o desempenho das suas funções durante a infecção pelo *Plasmodium*, são capazes de responder a alguns antígenos de malária.

Um dos fatores determinantes da homeostase da resposta imunológica é a interação entre as células dendríticas e as células T reguladoras. Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> apresentam um papel fundamental no controle da resposta imune, tanto dos antígenos próprios como dos não próprios, além de patógenos e comensais (Sakaguchi, 2005). Embora evidências consistentes, baseadas em modelos experimentais e em infecções por *P. falciparum*, sugiram que as células Treg possam ter papel relevante durante o desenvolvimento da infecção malárica (Vigario *et al.*, 2007; Cambos *et al.*, 2008; Walther *et al.*, 2009), os mecanismos pelos quais essas células poderiam atuar ainda não estão totalmente esclarecidos. Além disso, a associação entre as células Treg e a infecção por *P. vivax* ainda é pouco entendida.

Na segunda parte do nosso trabalho, foi observado um aumento significativo das células Treg no sangue periférico de indivíduos com malária vivax, quando comparados aos indivíduos nunca expostos à infecção. Dados controversos associam a expansão das células Treg durante a infecção malárica tanto a um aumento quanto a uma demora na instalação da infecção (Long *et al.*, 2003; Hisaeda *et al.*, 2004; Amante *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2007). No entanto, foi demonstrada uma correlação do número dessas células com o aumento da parasitemia (Walther *et al.*, 2005; Riley *et al.*, 2006; Minigo *et al.*, 2009), além de associação com malária clínica (Todryk *et al.*, 2008). De

fato, também observamos uma correlação positiva entre o número absoluto de células Treg e a carga parasitária. Embora o número de células Treg aumente de acordo com o aumento da parasitemia, a relação entre esses dois pontos ainda não está esclarecida. Entretanto, é possível que o aumento da atividade das células Treg possa ativar a modulação da resposta imune do hospedeiro e conseqüentemente permitir a sobrevivência do parasito e a sua multiplicação. Por outro lado, o aumento das Treg poderia limitar a exacerbação da patologia durante a infecção, o que poderia beneficiar o hospedeiro, ao evitar danos aos órgãos devido ao controle da resposta inflamatória.

Uma variedade de potenciais mediadores da atividade das células Treg que poderiam contribuir para a supressão da resposta imune tem sido identificados, incluindo GITR (McHugh *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2002), CTLA-4 (Chen *et al.*, 1998), FoxP3 (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003), além de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  (Levings *et al.*, 2002; Cools *et al.*, 2008; Shevach *et al.*, 2008). Nossos resultados demonstraram um aumento significativo dos linfócitos circulantes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> em indivíduos naturalmente infectados com malária vivax, e também uma correlação positiva do número dessas células com a parasitemia. Essas duas moléculas, GITR<sup>+</sup> e CTLA-4<sup>+</sup>, são expressas constitutivamente em células Treg naturais (Belkaid *et al.*, 2005) e são reguladas pela expressão de FoxP3 (Yagi *et al.*, 2004; Nocentini *et al.*, 2007). Inicialmente, a molécula GITR nas células Treg indicava uma atuação supressiva dessas células (McHugh *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2002; Shevach *et al.*, 2006b). Entretanto, verificou-se que embora não essencial para a atividade supressora (Nocentini *et al.*, 2007), o aumento da expressão dessa molécula promove a proliferação das células reguladoras (Nocentini *et al.*, 2007; Nishioka *et al.*, 2008), permitindo um aumento potencial da sua atividade supressora (Shevach *et al.*, 2006b). Todavia, o aumento de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> circulantes, co-expressando GITR<sup>+</sup> em indivíduos infectados, pode refletir parcialmente a expansão das células Treg observada nesses indivíduos. Nesse contexto, é possível sugerir que a proliferação das células reguladoras estaria aumentada devido a maior da expressão de GITR, regulada pelo fator FoxP3. Embora o efeito da sinalização de GITR nas células reguladoras durante a infecção pelo *P. vivax* não esteja totalmente elucidado, evidências da infecção em modelos murinos sugerem que a infecção altera

a expressão de GITR nas Treg, e isso pode eventualmente contribuir para o escape da resposta específica de células T pelo parasito (Hisaeda *et al.*, 2005).

A molécula CTLA-4 apresenta homologia parcial com o CD28 e interação, com maior afinidade, aos mesmos ligantes CD80 e CD86 (Alegre *et al.*, 2001). O efeito supressivo da CTLA-4 é associado à redução da produção de IL-2 e à expressão do receptor dessa molécula, além de ser capaz de manter células T na fase G1 do ciclo celular (Walunas *et al.*, 1994; Krummel *et al.*, 1995). Além disso, a expressão de CTLA-4 em células Treg induz a produção da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) por células apresentadoras de antígenos (DCs), que degradam triptofano. A falta desse aminoácido essencial inibe a ativação de células T e promove apoptose das mesmas (Fallarino *et al.*, 2003). Em infecções experimentais por *P. berghei* ficou demonstrado que o bloqueio da CTLA-4, utilizando-se anticorpos monoclonais, propiciou uma exacerbação da imunopatologia mediada pelo parasito (Jacobs *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2003).

O papel funcional da molécula CTLA-4 nas células T reguladoras ainda é bastante controverso (Bour-Jordan *et al.*, 2002); no nosso trabalho, verificamos que durante a infecção por *P. vivax* houve um aumento das células Treg expressando essa molécula, sugerindo que essa regulação da resposta imune possa ocorrer via CTLA-4, mediante contato direto entre células apresentadoras de antígenos e as Treg. Recentemente, outro estudo realizado no Brasil evidenciou um aumento das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> expressando a molécula imunomodulatória CTLA-4 em pacientes com malária vivax. Importa salientar que nesse trabalho foi observada uma correlação positiva dessas células com os níveis de parasitemia (Goncalves *et al.*, 2010), corroborando os nossos resultados previamente publicados (Bueno *et al.*, 2010). Uma redução da expressão de CTLA-4 foi observada em Fulani, grupo étnico africano bastante definido, contribuindo para a pouca susceptibilidade desses indivíduos à infecção pelo *Plasmodium*, e sugerindo que a alteração no processo de maturação das células Treg nesse grupo pode ser a causa da baixa geração de células reguladoras (Torcia *et al.*, 2008).

Foi ainda possível observar, no nosso estudo, que pacientes infectados por *P. vivax* apresentaram um aumento significativo das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>

produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$ , e que o número dessas células estava correlacionado positivamente com a parasitemia. Ambas citocinas exercem um papel crítico na regulação da resposta Th1 na malária experimental (Riley *et al.*, 2006), além de contribuir para a atividade supressiva das células reguladoras (von Boehmer, 2005). Essa atividade regulatória pode limitar a inflamação desencadeada durante a infecção, prevenindo a gravidade da doença. Entretanto, embora as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  sejam naturalmente produzidas por células Treg, ainda não está totalmente esclarecido como a multiplicação do parasito pode influenciar a produção dessas citocinas (Belkaid *et al.*, 2005). Por outro lado, observou-se também um aumento significativo no número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> produzindo citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e IL-17, e que o número dessas células também estava correlacionado positivamente com a parasitemia.

Recentemente, Scholzen e colaboradores (Scholzen *et al.*, 2009) demonstraram a produção intracelular de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17 por células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> com expressão intermediária da molécula FoxP3, sugerindo a presença de diferentes subpopulações de células reguladoras durante a infecção malárica. A evidência do papel dessas células durante a infecção por *P. vivax* foi demonstrada a partir de ensaio funcional em que se verificou uma redução da proliferação celular de PBMCs de indivíduos naturalmente infectados na presença de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Em indivíduos Mossi (grupo étnico africano susceptível à infecção por malária), culturas de PBMCs estimuladas por antígenos de malária, na ausência de células Treg, resultou no reestabelecimento da proliferação celular, quando comparadas a culturas de PBMCs na presença de antígenos do parasito e células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Torcia *et al.*, 2008). De fato, é importante ressaltar que células reguladoras podem limitar a patologia causada durante a infecção pelo parasito, controlando a resposta inflamatória, mas também podem comprometer o mecanismo efetor de destruição do parasito (Riley *et al.*, 2006).

Uma outra população celular, recentemente associada a infecções parasitárias, são as células Th17 que, mediadas pelas citocinas IL-17 e IL-17F, induzem a expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como consequência do recrutamento e ativação de várias linhagens de leucócitos (Iwakura *et al.*, 2008). Estudos controversos demonstram que as Th17 podem auxiliar na proteção contra as

infecções experimentais de *Trypanosoma cruzi* (Miyazaki *et al.*, 2010) e *Toxoplasma gondii* (Iwakura *et al.*, 2008). Por outro lado, na leishmaniose cutânea humana foi verificada uma relação com promoção da patogênese (Bacellar *et al.*, 2009), sugerindo que o papel da Th17 nas infecções parasitárias precisa ser elucidado.

Na terceira parte do nosso trabalho, demonstramos que indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax* apresentaram um aumento significativo das células Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) circulantes no sangue periférico. Entretanto, não foi verificada nenhuma associação entre o número absoluto dessas células com os parâmetros hematológicos avaliados (níveis de hemoglobina e plaquetas) e parasitemia. Embora os nossos dados não permitam nenhuma conclusão clara a respeito do papel dessas células na proteção ou patogênese, é importante apontar os dados obtidos por Ishida e colaboradores (2010), em que se demonstrou o desenvolvimento de malária cerebral e parasitemia patente durante a infecção *P. berghei* ANKA em camundongos deficientes para IL-17. Interessante ressaltar que a produção de IL-17 pelas células CD4<sup>+</sup> na malária foi demonstrada previamente para células Treg (Scholzen *et al.*, 2009; Bueno *et al.*, 2010), o que pode ser refletido na diferenciação de fenótipo de Th17 na presença de citocinas do tipo TGF- $\beta$  e IL-6 (Korn *et al.*, 2009). Existe uma relação bastante expressiva no processo de diferenciação entre as células Th17 e Treg, demonstrada *in vitro*, e o balanço entre esses dois tipos celulares poderia direcionar a resposta imune tanto para a resistência quanto para a susceptibilidade à infecção (Kimura *et al.*, 2010).

A resposta celular protetora contra a malária é iniciada por células apresentadoras de antígenos, que ativam células CD4<sup>+</sup> e levam ao controle da parasitemia, mediado pela ação das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2002). No nosso trabalho, demonstramos que indivíduos com malária vivax apresentaram aumento da expressão de IFN- $\gamma$  e diminuição da expressão de IL-10 em células CD4<sup>+</sup>. Além disso, demonstramos uma correlação direta entre o número absoluto de células Th17 e células CD4<sup>+</sup> circulantes produzindo IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ . Uma vez que a produção concomitante dessas citocinas não foi avaliada nesses indivíduos, não é possível afirmar se as células Th17 são também produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ , ou se a correlação observada somente reflete uma expansão coincidente entre essas subpopulações. Importa ressaltar que estudos recentes

demonstraram que as células Th17 são também fonte de IFN- $\gamma$  e IL-10 (McGeachy *et al.*, 2007; Lexberg *et al.*, 2010), mas trabalhos futuros são necessários para determinar a função precisa dessas células coexpressando IFN- $\gamma$  e IL-10. Ainda assim, a consequência do aumento na produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  em indivíduos infectados por *P. vivax* resultaria em um ambiente pró-inflamatório, incluindo indução da produção de reativos de oxigênio e nitrogênio (iNOS), peptídeos antimicrobicidas e outras citocinas, permitindo assim um ambiente de resposta imune favorável contra o parasito.

Muitos estudos indicam que a proteção contra a fase sanguínea da infecção é dependente tanto da resposta imune celular quanto humoral (Struik *et al.*, 2004; Good *et al.*, 2005; Langhorne *et al.*, 2008). Na resposta contra os estágios sanguíneos, a eliminação do parasito parece ocorrer após o desenvolvimento de uma resposta específica de anticorpos a antígenos variantes de superfície (Good *et al.*, 2005). O desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a malária tem sido perseguido exaustivamente por vários pesquisadores no mundo inteiro (Moorthy *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2007). Embora numerosos antígenos tenham sido descritos, nenhum obteve até agora uma resposta efetiva protetora, longa e duradoura. Não obstante, um progresso significativo foi alcançado, uma vez que vários antígenos candidatos a vacina estão sendo testados em fase pré-clínica e clínica (Webster *et al.*, 2003; Moorthy *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2007). Uma das proteínas mais promissoras a vir a compor uma vacina é o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) devido à eficácia observada depois do desafio feito com a proteína nativa ou recombinante em modelos experimentais e macacos (Deans *et al.*, 1988; Collins *et al.*, 1994; Anders *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2007). Alguns estudos de fase 1 em indivíduos infectados já foram realizados (Ockenhouse *et al.*, 1998; Malkin *et al.*, 2005; Saul *et al.*, 2005), e resultados de estudos de fase 2 são esperados em breve (Remarque *et al.*, 2008).

Na última parte do nosso trabalho, o nosso objetivo foi caracterizar regiões naturalmente imunogênicas para células B dentro da proteína Pv-AMA-1. Inicialmente foi observado que soros de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax* apresentaram mais de 60% de reconhecimento de anticorpos IgG específico para essa proteína. De fato, em estudos imunoepidemiológicos, já foi demonstrado que indivíduos com diferentes graus de exposição ao parasito apresentavam alto grau de



reconhecimento IgG específico para a proteína AMA-1 (Thomas *et al.*, 1994; Morais *et al.*, 2006; Gunasekera *et al.*, 2007). Também demonstramos uma proporção similar de reconhecimento de anticorpos IgG entre as proteínas AMA-1 e domínio II (DII), durante a infecção natural, corroborando estudos prévios em que foi verificado que o DII é uma região particularmente imunogênica da proteína AMA-1 (Mufalo *et al.*, 2008). Além disso, na análise de subclasses de IgG, foi observado um predomínio da produção de anticorpos IgG1 e IgG3 contra essas duas proteínas, que desempenham papel importante na resposta imune protetora mediada por anticorpos contra a malária (Druilhe *et al.*, 1987). Embora o padrão de subclasses de IgG contra a proteína AMA-1 já tenha sido caracterizado em infecções naturais (Morais *et al.*, 2006; Remarque *et al.*, 2008), demonstramos pela primeira vez a prevalência de isotipos de IgG específicos frente a proteína DII em indivíduos com malária vivax. Nos nossos estudos foi também observada uma equivalência no reconhecimento de anticorpos IgG e suas subclasses entre o ectodomínio (AMA-1) e DII, confirmando a imunodominância do DII dentro da proteína AMA-1.

A seleção de epitopos parasitários que aumentem a resposta protetora de anticorpos após imunizações poderia facilitar o desenvolvimento de uma vacina efetiva. A recente disponibilidade de genomas (Carlton *et al.*, 2008; Pain *et al.*, 2009), proteomas (Wastling *et al.*, 2009) e transcriptomas (Bozdech *et al.*, 2008) das espécies de *Plasmodium* e o desenvolvimento de algoritmos capazes de prever epitopos de células B (Blythe *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2006) facilitaram a identificação de antígenos vacinais promissores (Doolan, 2010), além de regiões imunodominantes dentro de candidatos já selecionados. No nosso estudo, analisamos a sequência primária de Pv-AMA-1 na busca de possíveis epitopos lineares de células B ocorrendo em regiões intrinsecamente desestruturadas/desordenadas (IURs). Nossos resultados demonstraram que epitopos preditos de células B são distribuídos por todos os três domínios da proteína. Portanto, considerando o alto grau de conservação da sequência de aminoácidos no DII tanto para *P. vivax* quanto para *P. falciparum* (Chesne-Seck *et al.*, 2005; Putaporntip *et al.*, 2009), a forte associação da resposta de anticorpos entre AMA-1 e domínio II, e o epitopo com maior pontuação de predição, selecionamos o peptídeo SASDQPTQYEEEMTDYQK para síntese química e análise imunológica. Esse

peptídeo não apresentou nenhuma homologia com a sequência genômica de camundongos e humanos, reforçando a possibilidade futura do seu uso em estudos pré-clínicos e clínicos.

A análise do peptídeo sintético usando soro de indivíduos naturalmente infectados com *P. vivax* que apresentavam reatividade prévia somente a proteína AMA-1, somente para o DII, e para ambos antígenos, demonstraram que o peptídeo selecionado foi reconhecido por todas as amostras de soros que reconheciam especificamente o domínio II. Além disso, soros de indivíduos infectados que não reconheciam previamente a proteína DII apresentaram positividade considerável (58,3%) contra o peptídeo sintético, sugerindo que, durante a infecção natural, ocorre a produção específica de anticorpos contra esse epitopo imunogênico. Esses resultados sugerem que esse peptídeo linear é altamente imunogênico durante a infecção natural por *P. vivax*, e provavelmente é a região mais imunogênica dentro do DII. Embora anticorpos tenham papel fundamental na resposta imune protetora contra os estágios sanguíneos da malária (Good *et al.*, 2010), não é possível determinar a contribuição real desses anticorpos frente a esses polipeptídeos na malária. No entanto, um estudo interessante realizado por Pizarro e colaboradores (Pizarro *et al.*, 2005), utilizando anticorpo monoclonal 4G2 específico para AMA-1 (inibidor da invasão eritrocítica de *P. falciparum*), demonstrou a importância de regiões desordenadas entre os resíduos 348 e 389 (equivalentes aos resíduos 293 a 334 de Pv-AMA-1) na invasão parasitária. A seleção de epitopos imunogênicos dentro da proteína AMA-1 poderia facilitar a transposição de alguns obstáculos ainda existentes no desenvolvimento de uma vacina, resultando na produção de peptídeos quiméricos em larga escala e, ainda, no dobramento correto de proteínas contendo múltiplos epitopos relevantes, fatores esses que são importantes para a geração de resposta imune efetora contra o parasito.

O desencadeamento da resposta imune efetora durante a infecção malárica é um processo complexo e que vem sendo caracterizado ao longo das últimas décadas. Apesar dos avanços realizados até o momento serem consideráveis, sobretudo para a infecção por *P. falciparum*, ainda não foi possível definir o balanço ideal entre imunidade e mecanismos que regulam a patologia, e porque a imunidade contra a infecção por *Plasmodium* pode aparentemente ser de curta duração. Os trabalhos

focados no entendimento da resposta imune contra a infecção por *P. vivax* ainda são escassos, e estudos adicionais ainda são necessários para elucidar o padrão de resposta protetora e fatores associados a imunopatologia. Ainda que a resposta imunológica contra as diferentes espécies de *Plasmodium* possa apresentar mecanismos efetores comuns, é importante ressaltar que o ciclo biológico do *P. vivax* apresenta diferenças importantes a serem consideradas como, por exemplo, a ocorrência de hipnozoítos e a formação de resposta inflamatória exacerbada (de maior magnitude da observada em resposta a *P. falciparum*) (Andrade *et al.*, 2010). Em nossos trabalhos foram feitos alguns avanços e foi possível caracterizar aspectos da resposta imune celular e humoral na infecção por malária vivax em pacientes sem complicações clínicas e provenientes de área de baixa endemicidade. Nossos resultados representam contribuições significativas para o conhecimento das relações parasito-hospedeiro, principalmente acerca dos mecanismos de defesa e regulação do hospedeiro frente a infecção por *P. vivax*.

## 7. CONCLUSÕES

- A infecção por *P. vivax* induz a modulação da maturação de células dendríticas, que pode ser parcialmente revertida após estímulo antigênico com Pv-AMA-1.
- Pv-AMA-1 induz um perfil imunológico de citocinas associadas à proteção clínica, importantes para o controle da infecção malárica.
- Durante a infecção por *P. vivax*, há tanto um aumento do número de células Treg ativadas no sangue periférico quanto das moléculas de superfície e de mediadores associados à supressão da resposta imune.
- O número de células Treg durante a infecção está diretamente correlacionado à parasitemia, mas não aos níveis de hemoglobina ou de plaquetas.
- As células Treg inibem a proliferação antígeno específica de PBMCs de indivíduos infectados por *P. vivax*.
- Durante a infecção por *P. vivax*, há um aumento do número de células Th17 no sangue periférico, acompanhado por um aumento do número de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e redução do número de células IL-10<sup>+</sup>.
- A produção de IL-17 está associada à produção concomitante de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-10.
- O número de células Th17 durante a infecção não está correlacionado à parasitemia, níveis de hemoglobina ou de plaquetas nos indivíduos avaliados em nosso estudo.
- Os perfis de respostas de anticorpos IgG e seus isotipos específicos anti-Pv-AMA-1 e anti-DII são similares em indivíduos naturalmente infectados por *P.*

*vivax*, indicando a imunodominância deste domínio dentro da proteína Pv-AMA-1.

- O peptídeo SASDQPTQYEEEMTDYQK demonstrou ser um epítipo de célula B altamente antigênico, devido a sua reatividade sorológica durante a infecção natural por *P. vivax*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol** 8:942-949, 2007.
- Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol** 4:499-511, 2004.
- Alecrim, M. S., Alecrim, D. W., Macedo, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine in Brazilian Amazon Region. **Rev Soc Bras Med Trop** 32:67-68, 1999.
- Alecrim, M. S., Alecrim, W. D., Albuquerque, B. C., Dourado, H. V., Wanssa, M. D. Resistance of *Plasmodium falciparum* in the Brazilian Amazon to the combination of sulfadoxine and pyremethamine. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 24:44-47, 1982.
- Alegre, M. L., Frauwirth, K. A., Thompson, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nat Rev Immunol** 1:220-228, 2001.
- Alves, F. P., Durlacher, R. R., Menezes, M. J., Krieger, H., Silva, L. H., Camargo, E. P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **Am J Trop Med Hyg** 66:641-648, 2002.
- Amante, F. H., Stanley, A. C., Randall, L. M., Zhou, Y., Haque, A., McSweeney, K., Waters, A. P., Janse, C. J., Good, M. F., Hill, G. R., Engwerda, C. R. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Am J Pathol** 171:548-559, 2007.
- Amino, R., Thiberge, S., Shorte, S., Frischknecht, F., Menard, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **C R Biol** 329:858-862, 2006.
- Anders, R. F., Crewther, P. E., Edwards, S., Margetts, M., Matthew, M. L., Pollock, B., Pye, D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine** 16:240-247, 1998.
- Andrade, B. B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S. M., Clarencio, J., Camargo, L. M., Barral, A., Barral-Netto, M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malar J** 9:13, 2010.

- Artavanis-Tsakonas, K., Riley, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J Immunol** 169:2956-2963, 2002.
- Bacellar, O., Faria, D., Nascimento, M., Cardoso, T. M., Gollob, K. J., Dutra, W. O., Scott, P., Carvalho, E. M. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis** 200:75-78, 2009.
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., Hafler, D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol** 167:1245-1253, 2001.
- Baird, J. K. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicrob Agents Chemother** 48:4075-4083, 2004.
- Baird, J. K. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends Parasitol** 23:533-539, 2007.
- Baird, J. K., Jones, T. R., Danudirgo, E. W., Annis, B. A., Bangs, M. J., Basri, H., Purnomo, Masbar, S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. **Am J Trop Med Hyg** 45:65-76, 1991.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol** 18:767-811, 2000.
- Banchereau, J., Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 392:245-252, 1998.
- Barcus, M. J., Basri, H., Picarima, H., Manyakori, C., Sekartuti, Elyazar, I., Bangs, M. J., Maguire, J. D., Baird, J. K. Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua. **Am J Trop Med Hyg** 77:984-991, 2007.
- Bassat, Q., Alonso, P. L. Defying malaria: Fathoming severe Plasmodium vivax disease. **Nat Med** 17:48-49, 2011.
- Beg, M. A., Khan, R., Baig, S. M., Gulzar, Z., Hussain, R., Smego, R. A., Jr. Cerebral involvement in benign tertian malaria. **Am J Trop Med Hyg** 67:230-232, 2002.
- Bejon, P., Mwacharo, J., Kai, O., Todryk, S., Keating, S., Lowe, B., Lang, T., Mwangi, T. W., Gilbert, S. C., Peshu, N., Marsh, K., Hill, A. V. The induction and persistence of T cell IFN-gamma responses after vaccination or natural exposure is suppressed by Plasmodium falciparum. **J Immunol** 179:4193-4201, 2007.
- Belkaid, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat Rev Immunol** 7:875-888, 2007.

- Belkaid, Y., Liesenfeld, O., Maizels, R. M. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: induction and control of regulatory T cells in the gastrointestinal tract: consequences for local and peripheral immune responses. *Clin Exp Immunol* 160:35-41, 2010.
- Belkaid, Y., Rouse, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6:353-360, 2005.
- Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8:345-350, 2007.
- Bledsoe, G. H. Malaria primer for clinicians in the United States. *South Med J* 98:1197-1204; quiz 1205, 1230, 2005.
- Blythe, M. J., Flower, D. R. Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods. *Protein Sci* 14:246-248, 2005.
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staeger, M. S., Stassen, M., Jonuleit, H., Schmitt, E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303-1310, 2007.
- Bour-Jordan, H., Blueston, J. A. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol* 22:1-7, 2002.
- Bousheri, S., Cao, H. New insight into the role of dendritic cells in malaria immune pathogenesis. *Trends Parasitol* 24:199-200, 2008.
- Bozdech, Z., Mok, S., Hu, G., Imwong, M., Jaidee, A., Russell, B., Ginsburg, H., Nosten, F., Day, N. P., White, N. J., Carlton, J. M., Preiser, P. R. The transcriptome of *Plasmodium vivax* reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16290-16295, 2008.
- Braga, E. M., Barros, R. M., Reis, T. A., Fontes, C. J., Morais, C. G., Martins, M. S., Krettli, A. U. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg* 66:461-466, 2002a.
- Braga, E. M., Carvalho, L. H., Fontes, C. J., Krettli, A. U. Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 66:299-303, 2002b.
- Bruna-Romero, O., Rodriguez, A. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. *Infect Immun* 69:5173-5176, 2001.



- Bueno, L. L., Fujiwara, R. T., Soares, I. S., Braga, E. M. Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-1<sub>19</sub> on the innate immune response. **Vaccine** doi:10.1016/j.vaccine.2007.12.031:2008.
- Bueno, L. L., Morais, C. G., Araujo, F. F., Gomes, J. A., Correa-Oliveira, R., Soares, I. S., Lacerda, M. V., Fujiwara, R. T., Braga, E. M. Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. **PLoS One** 5:e9623, 2010.
- Bueno, L. L., Morais, C. G., Soares, I. S., Bouillet, L. E., Bruna-Romero, O., Fontes, C. J., Fujiwara, R. T., Braga, E. M. Plasmodium vivax recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. **Vaccine** 27:5581-5588, 2009.
- Camargo, L. M., dal Colletto, G. M., Ferreira, M. U., Gurgel Sde, M., Escobar, A. L., Marques, A., Krieger, H., Camargo, E. P., da Silva, L. H. Hypoendemic malaria in Rondonia (Brazil, western Amazon region): seasonal variation and risk groups in an urban locality. **Am J Trop Med Hyg** 55:32-38, 1996.
- Cambos, M., Belanger, B., Jacques, A., Roulet, A., Scorza, T. Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion. **Int J Parasitol** 38:229-238, 2008.
- Carlton, J. M., Adams, J. H., Silva, J. C., Bidwell, S. L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S. V., Merino, E. F., Amedeo, P., Cheng, Q., Coulson, R. M., Crabb, B. S., Del Portillo, H. A., Essien, K., Feldblyum, T. V., Fernandez-Becerra, C., Gilson, P. R., Gueye, A. H., Guo, X., Kang'a, S., Kooij, T. W., Korsinczky, M., Meyer, E. V., Nene, V., Paulsen, I., White, O., Ralph, S. A., Ren, Q., Sargeant, T. J., Salzberg, S. L., Stoeckert, C. J., Sullivan, S. A., Yamamoto, M. M., Hoffman, S. L., Wortman, J. R., Gardner, M. J., Galinski, M. R., Barnwell, J. W., Fraser-Liggett, C. M. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. **Nature** 455:757-763, 2008.
- Carrolo, M., Giordano, S., Cabrita-Santos, L., Corso, S., Vigario, A. M., Silva, S., Leiriao, P., Carapau, D., Armas-Portela, R., Comoglio, P. M., Rodriguez, A., Mota, M. M. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. **Nat Med** 9:1363-1369, 2003.
- Carvalho, B. O., Lopes, S. C., Nogueira, P. A., Orlandi, P. P., Bargieri, D. Y., Blanco, Y. C., Mamoni, R., Leite, J. A., Rodrigues, M. M., Soares, I. S., Oliveira, T. R., Wunderlich, G., Lacerda, M. V., del Portillo, H. A., Araujo, M. O., Russell, B., Suwanarusk, R., Snounou, G., Renia, L., Costa, F. T. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. **J Infect Dis** 202:638-647, 2010.

- Chen, W., Jin, W., Wahl, S. M. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. **J Exp Med** 188:1849-1857, 1998.
- Chesne-Seck, M. L., Pizarro, J. C., Vulliez-Le Normand, B., Collins, C. R., Blackman, M. J., Faber, B. W., Remarque, E. J., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Bentley, G. A. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. **Mol Biochem Parasitol** 144:55-67, 2005.
- Chitnis, C. E., Blackman, M. J. Host cell invasion by malaria parasites. **Parasitol Today** 16:411-415, 2000.
- Chizzolini, C., Trottein, F., Bernard, F. X., Kaufmann, M. H. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. **Am J Trop Med Hyg** 45:57-64, 1991.
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., Akira, S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **J Exp Med** 201:19-25, 2005.
- Cohen, S., Butcher, G. A. Serum antibody in acquired malarial immunity. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 65:125-135, 1971.
- Cohen, S., Mc, G. I., Carrington, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature** 192:733-737, 1961.
- Collins, W. E., Pye, D., Crewther, P. E., Vandenberg, K. L., Galland, G. G., Sulzer, A. J., Kemp, D. J., Edwards, S. J., Coppel, R. L., Sullivan, J. S., et al. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. **Am J Trop Med Hyg** 51:711-719, 1994.
- Cools, N., Van Tendeloo, V. F., Smits, E. L., Lenjou, M., Nijs, G., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N., Ponsaerts, P. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. **J Cell Mol Med** 12:690-700, 2008.
- Couper, K. N., Blount, D. G., Wilson, M. S., Hafalla, J. C., Belkaid, Y., Kamanaka, M., Flavell, R. A., de Souza, J. B., Riley, E. M. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. **PLoS Pathog** 4:e1000004, 2008.
- Coura, J. R., Suarez-Mutis, M., Ladeia-Andrade, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection-a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101:229-237, 2006.

- Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., Shamsul, S. S., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H. A., Conway, D. J., Singh, B. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. ***Clin Infect Dis*** 46:165-171, 2008.
- Cui, L., Escalante, A. A., Imwong, M., Snounou, G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. ***Trends Parasitol*** 19:220-226, 2003.
- de Castro, M. C., Monte-Mor, R. L., Sawyer, D. O., Singer, B. H. Malaria risk on the Amazon frontier. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 103:2452-2457, 2006.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., Robson, S. C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. ***J Exp Med*** 204:1257-1265, 2007.
- Deans, J. A., Knight, A. M., Jean, W. C., Waters, A. P., Cohen, S., Mitchell, G. H. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. ***Parasite Immunol*** 10:535-552, 1988.
- Dicko, A., Diemert, D. J., Sagara, I., Sogoba, M., Niambele, M. B., Assadou, M. H., Guindo, O., Kamate, B., Baby, M., Sissoko, M., Malkin, E. M., Fay, M. P., Thera, M. A., Miura, K., Dolo, A., Diallo, D. A., Mullen, G. E., Long, C. A., Saul, A., Doumbo, O., Miller, L. H. Impact of a *Plasmodium falciparum* AMA1 Vaccine on Antibody Responses in Adult Malians. ***PLoS ONE*** 2:e1045, 2007.
- Doolan, D. L. Plasmodium immunomics. ***Int J Parasitol*** 41:3-20, 2010.
- Doolan, D. L., Hoffman, S. L. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. ***J Immunol*** 163:884-892, 1999.
- Doolan, D. L., Southwood, S., Freilich, D. A., Sidney, J., Graber, N. L., Shatney, L., Bebris, L., Florens, L., Dobano, C., Witney, A. A., Appella, E., Hoffman, S. L., Yates, J. R., 3rd, Carucci, D. J., Sette, A. Identification of *Plasmodium falciparum* antigens by antigenic analysis of genomic and proteomic data. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 100:9952-9957, 2003.
- Druilhe, P., Khusmith, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. ***Infect Immun*** 55:888-891, 1987.
- Dyer, M., Day, K. P. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. ***Parasitol Today*** 16:102-107, 2000.

- Egan, A. F., Morris, J., Barnish, G., Allen, S., Greenwood, B. M., Kaslow, D. C., Holder, A. A., Riley, E. M. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. ***J Infect Dis*** 173:765-769, 1996.
- Elloso, M. M., van der Heyde, H. C., vande Waa, J. A., Manning, D. D., Weidanz, W. P. Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells. ***J Immunol*** 153:1187-1194, 1994.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., Puccetti, P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. ***Nat Immunol*** 4:1206-1212, 2003.
- Feng, Z. P., Keizer, D. W., Stevenson, R. A., Yao, S., Babon, J. J., Murphy, V. J., Anders, R. F., Norton, R. S. Structure and inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. ***J Mol Biol*** 350:641-656, 2005.
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., Munz, C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. ***J Exp Med*** 195:343-351, 2002.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. ***Nat Immunol*** 4:330-336, 2003.
- Franke-Fayard, B., Trueman, H., Ramesar, J., Mendoza, J., van der Keur, M., van der Linden, R., Sinden, R. E., Waters, A. P., Janse, C. J. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. ***Mol Biochem Parasitol*** 137:23-33, 2004.
- Franklin, B. S., Rodrigues, S. O., Antonelli, L. R., Oliveira, R. V., Goncalves, A. M., Sales-Junior, P. A., Valente, E. P., Alvarez-Leite, J. I., Ropert, C., Golenbock, D. T., Gazzinelli, R. T. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. ***Microbes Infect*** 9:881-890, 2007.
- Frevert, U. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. ***Trends Parasitol*** 20:417-424, 2004.
- Galinski, M. R., Barnwell, J. W. *Plasmodium vivax*: who cares? ***Malar J*** 7 Suppl 1:S9, 2008.
- Garraud, O., Perraut, R., Gysin, J., Behr, C., Dubois, P., Bonnemains, B., Jouin, H., Michel, J. C., Pereira da Silva, L. Manipulating blood T cells and B cells from squirrel monkeys: some technical considerations. ***J Immunol Methods*** 173:165-173, 1994.

- Garraud, O., Poingt, J. P., Perraut, R., Gysin, J. Peripheral blood mononuclear cells in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*: characterization and functional aspects of T lymphocytes. **Res Immunol** 140:857-874, 1989.
- Gazzinelli, R. T., Ropert, C., Campos, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. **Immunol Rev** 201:9-25, 2004.
- Gentil, F., Bargieri, D. Y., Leite, J. A., Francoso, K. S., Patricio, M. B., Espindola, N. M., Vaz, A. J., Palatnik-de-Sousa, C. B., Rodrigues, M. M., Costa, F. T., Soares, I. S. A recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine** 28:6183-6190, 2010.
- Genton, B., D'Acremont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J. C., Alpers, M. P., Muller, I. Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Med** 5:e127, 2008.
- Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., Trinchieri, G. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. **J Immunol** 174:727-734, 2005.
- Golenda, C. F., Li, J., Rosenberg, R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite Plasmodium vivax. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94:6786-6791, 1997.
- Golgher, D., Gazzinelli, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity** 37:399-409, 2004.
- Goncalves, R. M., Salmazi, K. C., Santos, B. A., Bastos, M. S., Rocha, S. C., Boscardin, S. B., Silber, A. M., Kallas, E. G., Ferreira, M. U., Scopel, K. K. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? **Infect Immun** 78:4763-4772, 2010.
- Good, M. F., Doolan, D. L. Malaria vaccine design: immunological considerations. **Immunity** 33:555-566, 2010.
- Good, M. F., Xu, H., Wykes, M., Engwerda, C. R. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annu Rev Immunol** 23:69-99, 2005.
- Goonewardene, R., Carter, R., Gamage, C. P., Del Giudice, G., David, P. H., Howie, S., Mendis, K. N. Human T cell proliferative responses to Plasmodium vivax

- antigens: evidence of immunosuppression following prolonged exposure to endemic malaria. *Eur J Immunol* 20:1387-1391, 1990.
- Greenwood, B. M., Bradley-Moore, A. M., Bryceson, A. D., Palit, A. Immunosuppression in children with malaria. *Lancet* 1:169-172, 1972.
- Grynberg, P., Fernandes Fontes, C. J., Braga, E. M. Association between particular polymorphic residues on apical membrane antigen 1 (AMA-1) and platelet levels in patients with vivax malaria. *Clin Microbiol Infect* 13:1089-1094, 2007.
- Guerra, C. A., Snow, R. W., Hay, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol* 22:353-358, 2006.
- Guiton, R., Vasseur, V., Charron, S., Arias, M. T., Van Langendonck, N., Buzoni-Gatel, D., Ryffel, B., Dimier-Poisson, I. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J Infect Dis* 202:427-435, 2010.
- Gunasekera, A. M., Wickramarachchi, T., Neafsey, D. E., Ganguli, I., Perera, L., Premaratne, P. H., Hartl, D., Handunnetti, S. M., Udagama-Randeniya, P. V., Wirth, D. F. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol* 24:939-947, 2007.
- Hansen, D. S., Schofield, L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? *PLoS Pathog* 6:e1000771, 2010.
- Hay, S. I., Guerra, C. A., Tatem, A. J., Noor, A. M., Snow, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 4:327-336, 2004.
- Hensmann, M., Kwiatkowski, D. Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 69:2364-2371, 2001.
- Herrera, S., Corradin, G., Arevalo-Herrera, M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol* 23:122-128, 2007.
- Hisaeda, H., Hamano, S., Mitoma-Obata, C., Tetsutani, K., Imai, T., Waldmann, H., Himeno, K., Yasutomo, K. Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family-related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection. *Eur J Immunol* 35:3516-3524, 2005.
- Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K., Tsukumo, S., Yasutomo, K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med* 10:29-30, 2004.

- Hodder, A. N., Crewther, P. E., Matthew, M. L., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Anders, R. F. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. **J Biol Chem** 271:29446-29452, 1996.
- Hogh, B., Marbiah, N. T., Burghaus, P. A., Andersen, P. K. Relationship between maternally derived anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, west Africa, in which malaria is highly endemic. **Infect Immun** 63:4034-4038, 1995.
- Hondowicz, B., Scott, P. Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*. **Microbes Infect** 1:65-71, 1999.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science** 299:1057-1061, 2003.
- Ing, R., Segura, M., Thawani, N., Tam, M., Stevenson, M. M. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. **J Immunol** 176:441-450, 2006.
- Ishida, H., Matsuzaki-Moriya, C., Imai, T., Yanagisawa, K., Nojima, Y., Suzue, K., Hirai, M., Iwakura, Y., Yoshimura, A., Hamano, S., Shimokawa, C., Hisaeda, H. Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. **Biochem Biophys Res Commun** 402:790-795, 2010.
- Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunol Rev** 226:57-79, 2008.
- Jacobs, P., Radzioch, D., Stevenson, M. M. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. **Infect Immun** 64:44-49, 1996a.
- Jacobs, P., Radzioch, D., Stevenson, M. M. A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. **Infect Immun** 64:535-541, 1996b.
- Jacobs, T., Graefe, S. E., Niknafs, S., Gaworski, I., Fleischer, B. Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. **J Immunol** 169:2323-2329, 2002.
- Jangpatarapongsa, K., Chootong, P., Sattabongkot, J., Chotivanich, K., Sirichaisinthop, J., Tungpradabkul, S., Hisaeda, H., Troye-Blomberg, M., Cui, L., Udomsangpetch, R. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. **Eur J Immunol** 38:2697-2705, 2008.

- Kappe, S. H., Kaiser, K., Matuschewski, K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. ***Trends Parasitol*** 19:135-143, 2003.
- Kimura, A., Kishimoto, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. ***Eur J Immunol*** 40:1830-1835, 2010.
- Kochar, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V., Das, A. *Plasmodium vivax* malaria. ***Emerg Infect Dis*** 11:132-134, 2005.
- Kocken, C. H., Dubbeld, M. A., Van Der Wel, A., Pronk, J. T., Waters, A. P., Langermans, J. A., Thomas, A. W. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. ***Infect Immun*** 67:43-49, 1999.
- Kocken, C. H., Withers-Martinez, C., Dubbeld, M. A., van der Wel, A., Hackett, F., Valderrama, A., Blackman, M. J., Thomas, A. W. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. ***Infect Immun*** 70:4471-4476, 2002.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. ***Annu Rev Immunol*** 27:485-517, 2009.
- Krotoski, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. ***Trans R Soc Trop Med Hyg*** 79:1-11, 1985.
- Krummel, M. F., Allison, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. ***J Exp Med*** 182:459-465, 1995.
- Kumar, S., Melzer, M., Dodds, P., Watson, J., Ord, R. *P. vivax* malaria complicated by shock and ARDS. ***Scand J Infect Dis*** 39:255-256, 2007.
- Lal, A. A., Hughes, M. A., Oliveira, D. A., Nelson, C., Bloland, P. B., Oloo, A. J., Hawley, W. E., Hightower, A. W., Nahlen, B. L., Udhayakumar, V. Identification of T-cell determinants in natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in an adult population exposed to malaria. ***Infect Immun*** 64:1054-1059, 1996.
- Lang, C., Gross, U., Luder, C. G. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. ***Parasitol Res*** 100:191-203, 2007.
- Langhorne, J., Albano, F. R., Hensmann, M., Sanni, L., Cadman, E., Voisine, C., Sponaas, A. M. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. ***Immunol Rev*** 201:35-47, 2004.



- Langhorne, J., Morris-Jones, S., Casabo, L. G., Goodier, M. The response of gamma delta T cells in malaria infections: a hypothesis. **Res Immunol** 145:429-436, 1994.
- Langhorne, J., Ndungu, F. M., Sponaas, A. M., Marsh, K. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat Immunol** 9:725-732, 2008.
- Larsen, J. E., Lund, O., Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Res** 2:2, 2006.
- Lehner, T., Wang, Y., Pido-Lopez, J., Whittall, T., Bergmeier, L. A., Babaahmady, K. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. **Vaccine** 2007.
- Leisewitz, A. L., Rockett, K. A., Gumedde, B., Jones, M., Urban, B., Kwiatkowski, D. P. Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection. **Infect Immun** 72:4233-4239, 2004.
- Levings, M. K., Bacchetta, R., Schulz, U., Roncarolo, M. G. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. **Int Arch Allergy Immunol** 129:263-276, 2002.
- Lexberg, M. H., Taubner, A., Albrecht, I., Lepenies, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., Chang, H. D. IFN-gamma and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. **Eur J Immunol** 40:3017-3027, 2010.
- Li, F., Dluzewski, A., Coley, A. M., Thomas, A., Tilley, L., Anders, R. F., Foley, M. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. **J Biol Chem** 277:50303-50310, 2002.
- Loiola, C. C., da Silva, C. J., Tauil, P. L. [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. **Rev Panam Salud Publica** 11:235-244, 2002.
- Long, T. T., Nakazawa, S., Onizuka, S., Huaman, M. C., Kanbara, H. Influence of CD4+CD25+ T cells on *Plasmodium berghei* NK65 infection in BALB/c mice. **Int J Parasitol** 33:175-183, 2003.
- Lunel, F., Druilhe, P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. **Infect Immun** 57:2043-2049, 1989.
- Luyendyk, J., Olivas, O. R., Ginger, L. A., Avery, A. C. Antigen-presenting cell function during *Plasmodium yoelii* infection. **Infect Immun** 70:2941-2949, 2002.

- Malkin, E. M., Diemert, D. J., McArthur, J. H., Perreault, J. R., Miles, A. P., Giersing, B. K., Mullen, G. E., Orcutt, A., Muratova, O., Awkal, M., Zhou, H., Wang, J., Stowers, A., Long, C. A., Mahanty, S., Miller, L. H., Saul, A., Durbin, A. P. Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. ***Infect Immun*** 73:3677-3685, 2005.
- Marques, A. Human migration and spread of malaria in Brazil. ***Parasitol Today*** 3:166-170, 1987.
- McCall, M. B., Netea, M. G., Hermsen, C. C., Jansen, T., Jacobs, L., Golenbock, D., van der Ven, A. J., Sauerwein, R. W. Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. ***J Immunol*** 179:162-171, 2007.
- McGeachy, M. J., Bak-Jensen, K. S., Chen, Y., Tato, C. M., Blumenschein, W., McClanahan, T., Cua, D. J. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. ***Nat Immunol*** 8:1390-1397, 2007.
- McGregor, I. A. Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of antibody responses in malaria in man. ***Bull World Health Organ*** 50:259-266, 1974.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., Byrne, M. C. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. ***Immunity*** 16:311-323, 2002.
- Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. ***Nature*** 449:819-826, 2007.
- Mendis, K., Sina, B. J., Marchesini, P., Carter, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. ***Am J Trop Med Hyg*** 64:97-106, 2001.
- Millington, O. R., Di Lorenzo, C., Phillips, R. S., Garside, P., Brewer, J. M. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. ***J Biol*** 5:5, 2006.
- Minigo, G., Woodberry, T., Piera, K. A., Salwati, E., Tjitra, E., Kenangalem, E., Price, R. N., Engwerda, C. R., Anstey, N. M., Plebanski, M. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. ***PLoS Pathog*** 5:e1000402, 2009.

- Mitchell, G. H., Thomas, A. W., Margos, G., Dluzewski, A. R., Bannister, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infect Immun** 72:154-158, 2004.
- Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimanoe, Y., Iwakura, Y., Yoshida, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol** 185:1150-1157, 2010.
- Moorthy, V. S., Good, M. F., Hill, A. V. Malaria vaccine developments. **Lancet** 363:150-156, 2004.
- Morais, C. G., Soares, I. S., Carvalho, L. H., Fontes, C. J., Krettli, A. U., Braga, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. **Am J Trop Med Hyg** 75:582-587, 2006.
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Rodriguez, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science** 291:141-144, 2001.
- Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., del Portillo, H. A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Dis** 9:555-566, 2009.
- Mufalo, B. C., Gentil, F., Bargieri, D. Y., Costa, F. T., Rodrigues, M. M., Soares, I. S. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes Infect** 10:1266-1273, 2008.
- Nair, M., Hinds, M. G., Coley, A. M., Hodder, A. N., Foley, M., Anders, R. F., Norton, R. S. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). **J Mol Biol** 322:741-753, 2002.
- Nardin, E. H., Nussenzweig, R. S. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. **Annu Rev Immunol** 11:687-727, 1993.
- Natarajan, R., Thathy, V., Mota, M. M., Hafalla, J. C., Menard, R., Vernick, K. D. Fluorescent *Plasmodium berghei* sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites. **Cell Microbiol** 3:371-379, 2001.

- Nebl, T., De Veer, M. J., Schofield, L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology* 130 Suppl:S45-62, 2005.
- Nie, C. Q., Bernard, N. J., Schofield, L., Hansen, D. S. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T-cell function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. *Infect Immun* 75:2275-2282, 2007.
- Nishioka, T., Nishida, E., Iida, R., Morita, A., Shimizu, J. In vivo expansion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells mediated by GITR molecules. *Immunol Lett* 121:97-104, 2008.
- Nocentini, G., Ronchetti, S., Cuzzocrea, S., Riccardi, C. GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol* 37:1165-1169, 2007.
- Ocana-Morgner, C., Mota, M. M., Rodriguez, A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med* 197:143-151, 2003.
- Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Welde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U., Farley, L., Wirtz, R. A., Sadoff, J. C., Kaslow, D. C., Kumar, S., Church, L. W., Crutcher, J. M., Wizel, B., Hoffman, S., Lalvani, A., Hill, A. V., Tine, J. A., Guito, K. P., de Taisne, C., Anders, R., Ballou, W. R., et al. Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 177:1664-1673, 1998.
- O'Garra, A., Vieira, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10:801-805, 2004a.
- O'Garra, A., Vieira, P. L., Vieira, P., Goldfeld, A. E. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 114:1372-1378, 2004b.
- Ojo-Amaize, E. A., Vilcek, J., Cochrane, A. H., Nussenzweig, R. S. *Plasmodium berghei* sporozoites are mitogenic for murine T cells, induce interferon, and activate natural killer cells. *J Immunol* 133:1005-1009, 1984.
- Oliveira-Ferreira, J., Lacerda, M. V., Brasil, P., Ladislau, J. L., Tauil, P. L., Daniel-Ribeiro, C. T. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9:115, 2010.
- Pain, A., Hertz-Fowler, C. Plasmodium genomics: latest milestone. *Nat Rev Microbiol* 7:180-181, 2009.

- Palmer, C. J., Makler, M., Klaskala, W. I., Lindo, J. F., Baum, M. K., Ager, A. L. Increased prevalence of *Plasmodium falciparum* malaria in Honduras, Central America. **Rev Panam Salud Publica** 4:40-42, 1998.
- Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., Halmen, K. A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D. C., Gazzinelli, R. T., Golenbock, D. T. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104:1919-1924, 2007.
- Passos, S. T., Silver, J. S., O'Hara, A. C., Sehy, D., Stumhofer, J. S., Hunter, C. A. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. **J Immunol** 184:1776-1783, 2010.
- Perry, J. A., Olver, C. S., Burnett, R. C., Avery, A. C. Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. **J Immunol** 174:5921-5925, 2005.
- Perry, J. A., Rush, A., Wilson, R. J., Olver, C. S., Avery, A. C. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. **J Immunol** 172:475-482, 2004.
- Peterson, M. G., Marshall, V. M., Smythe, J. A., Crewther, P. E., Lew, A., Silva, A., Anders, R. F., Kemp, D. J. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. **Mol Cell Biol** 9:3151-3154, 1989.
- Pichyangkul, S., Yongvanitchit, K., Kum-arb, U., Hemmi, H., Akira, S., Krieg, A. M., Heppner, D. G., Stewart, V. A., Hasegawa, H., Looareesuwan, S., Shanks, G. D., Miller, R. S. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. **J Immunol** 172:4926-4933, 2004.
- Pizarro, J. C., Vulliez-Le Normand, B., Chesne-Seck, M. L., Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Blackman, M. J., Faber, B. W., Remarque, E. J., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Bentley, G. A. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science** 308:408-411, 2005.
- Plebanski, M., Flanagan, K. L., Lee, E. A., Reece, W. H., Hart, K., Gelder, C., Gillespie, G., Pinder, M., Hill, A. V. Interleukin 10-mediated immunosuppression by a variant CD4 T cell epitope of *Plasmodium falciparum*. **Immunity** 10:651-660, 1999.
- Polhemus, M. E., Magill, A. J., Cummings, J. F., Kester, K. E., Ockenhouse, C. F., Lanar, D. E., Dutta, S., Barbosa, A., Soisson, L., Diggs, C. L., Robinson, S. A., Haynes, J. D., Stewart, V. A., Ware, L. A., Brando, C., Krzych, U., Bowden, R. A., Cohen, J. D., Dubois, M. C., Ofori-Anyinam, O., De-Kock, E., Ballou, W. R., Heppner, D. G., Jr. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of

- Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. **Vaccine** 25:4203-4212, 2007.
- Pombo, D. J., Lawrence, G., Hirunpetcharat, C., Rzepczyk, C., Bryden, M., Cloonan, N., Anderson, K., Mahakunkijcharoen, Y., Martin, L. B., Wilson, D., Elliott, S., Eisen, D. P., Weinberg, J. B., Saul, A., Good, M. F. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **Lancet** 360:610-617, 2002.
- Pouniotis, D. S., Proudfoot, O., Bogdanoska, V., Scalzo, K., Kovacevic, S., Coppel, R. L., Plebanski, M. Selectively impaired CD8+ but not CD4+ T cell cycle arrest during priming as a consequence of dendritic cell interaction with *Plasmodium*-infected red cells. **J Immunol** 175:3525-3533, 2005.
- Price, R. N., Douglas, N. M., Anstey, N. M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Curr Opin Infect Dis** 22:430-435, 2009.
- Price, R. N., Tjitra, E., Guerra, C. A., Yeung, S., White, N. J., Anstey, N. M. Vivax malaria: neglected and not benign. **Am J Trop Med Hyg** 77:79-87, 2007.
- Putaporntip, C., Jongwutiwes, S., Grynberg, P., Cui, L., Hughes, A. L. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. **Infect Genet Evol** 9:1295-1300, 2009.
- Randall, L. M., Amante, F. H., McSweeney, K. A., Zhou, Y., Stanley, A. C., Haque, A., Jones, M. K., Hill, G. R., Boyle, G. M., Engwerda, C. R. Common strategies to prevent and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. **Infect Immun** 76:3312-3320, 2008.
- Remarque, E. J., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol** 24:74-84, 2008.
- Riley, E. M., Wahl, S., Perkins, D. J., Schofield, L. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunol** 28:35-49, 2006.
- Rodrigues, M. H., Rodrigues, K. M., Oliveira, T. R., Comodo, A. N., Rodrigues, M. M., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Soares, I. S. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Int J Parasitol** 35:185-192, 2005.
- Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., Foucault, C., Chongsuphajaisiddhi, T., Druilhe, P.

- Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 45:297-308, 1991.
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562, 2004.
- Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352, 2005.
- Sakaguchi, S., Powrie, F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317:627-629, 2007.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164, 1995.
- Saleri, N., Gulletta, M., Matteelli, A., Caligaris, S., Tomasoni, L. R., Antonini, B., Perandin, F., Castelli, F. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria in traveler returning from Venezuela. *J Travel Med* 13:112-113, 2006.
- San Sebastian, M., Jativa, R., Goicolea, I. Epidemiology of malaria in the Amazon basin of Ecuador. *Rev Panam Salud Publica* 7:24-28, 2000.
- Saul, A., Lawrence, G., Allworth, A., Elliott, S., Anderson, K., Rzepczyk, C., Martin, L. B., Taylor, D., Eisen, D. P., Irving, D. O., Pye, D., Crewther, P. E., Hodder, A. N., Murphy, V. J., Anders, R. F. A human phase 1 vaccine clinical trial of the Plasmodium falciparum malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine* 23:3076-3083, 2005.
- Sawyer, D. Economic and social consequences of malaria in new colonization projects in Brazil. *Soc Sci Med* 37:1131-1136, 1993.
- Schmieg, J., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Tsuji, M. The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Microbes Infect* 5:499-506, 2003.
- Schofield, L., Grau, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5:722-735, 2005.
- Scholzen, A., Minigo, G., Plebanski, M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends Parasitol* 26:16-25, 2010.

- Scholzen, A., Mittag, D., Rogerson, S. J., Cooke, B. M., Plebanski, M. *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFβ. ***PLoS Pathog*** 5:e1000543, 2009.
- Sehgal, V. M., Siddiqui, W. A., Alpers, M. P. A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. ***Trans R Soc Trop Med Hyg*** 83 Suppl:105-106, 1989.
- Seixas, E., Cross, C., Quin, S., Langhorne, J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. ***Eur J Immunol*** 31:2970-2978, 2001.
- Serghides, L., Smith, T. G., Patel, S. N., Kain, K. C. CD36 and malaria: friends or foes? ***Trends Parasitol*** 19:461-469, 2003.
- Sharma, V. P. Current scenario of malaria in India. ***Parassitologia*** 41:349-353, 1999.
- Shear, H. L., Srinivasan, R., Nolan, T., Ng, C. Role of IFN-γ in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. ***J Immunol*** 143:2038-2044, 1989.
- Shevach, E. M., DiPaolo, R. A., Andersson, J., Zhao, D. M., Stephens, G. L., Thornton, A. M. The lifestyle of naturally occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. ***Immunol Rev*** 212:60-73, 2006a.
- Shevach, E. M., Stephens, G. L. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? ***Nat Rev Immunol*** 6:613-618, 2006b.
- Shevach, E. M., Tran, D. Q., Davidson, T. S., Andersson, J. The critical contribution of TGF-β to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. ***Eur J Immunol*** 38:915-917, 2008.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., Sakaguchi, S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. ***Nat Immunol*** 3:135-142, 2002.
- Silvie, O., Franetich, J. F., Charrin, S., Mueller, M. S., Siau, A., Bodescot, M., Rubinstein, E., Hannoun, L., Charoenvit, Y., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Blackman, M. J., Anders, R. F., Pluschke, G., Mazier, D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. ***J Biol Chem*** 279:9490-9496, 2004.



- Skorokhod, O. A., Alessio, M., Mordmuller, B., Arese, P., Schwarzer, E. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. **J Immunol** 173:4066-4074, 2004.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y., Hay, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature** 434:214-217, 2005.
- Stevenson, M. M., Riley, E. M. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol** 4:169-180, 2004.
- Stevenson, M. M., Tam, M. F., Wolf, S. F., Sher, A. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. **J Immunol** 155:2545-2556, 1995.
- Stowers, A. W., Kennedy, M. C., Keegan, B. P., Saul, A., Long, C. A., Miller, L. H. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. **Infect Immun** 70:6961-6967, 2002.
- Struik, S. S., Riley, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunol Rev** 201:268-290, 2004.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J. M., Menard, R., Heussler, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science** 313:1287-1290, 2006.
- Tang, Q., Adams, J. Y., Tooley, A. J., Bi, M., Fife, B. T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R. M., Krummel, M. F., Bluestone, J. A. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. **Nat Immunol** 7:83-92, 2006.
- Thomas, A. W., Trape, J. F., Rogier, C., Gonçalves, A., Rosário, V. E., Narum, D. L. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 51:730-740, 1994.
- Tjitra, E., Anstey, N. M., Sugiarto, P., Warikar, N., Kenangalem, E., Karyana, M., Lambah, D. A., Price, R. N. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Med** 5:e128, 2008.

- Todryk, S. M., Bejon, P., Mwangi, T., Plebanski, M., Urban, B., Marsh, K., Hill, A. V., Flanagan, K. L. Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4 CD25 high T cells with susceptibility in Kenyans. **PLoS One** 3:e2027, 2008.
- Torcia, M. G., Santarlaschi, V., Cosmi, L., Clemente, A., Maggi, L., Mangano, V. D., Verra, F., Bancone, G., Nebie, I., Sirima, B. S., Liotta, F., Frosali, F., Angeli, R., Severini, C., Sannella, A. R., Bonini, P., Lucibello, M., Maggi, E., Garaci, E., Coluzzi, M., Cozzolino, F., Annunziato, F., Romagnani, S., Modiano, D. Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105:646-651, 2008.
- Treeck, M., Zacherl, S., Herrmann, S., Cabrera, A., Kono, M., Struck, N. S., Engelberg, K., Haase, S., Frischknecht, F., Miura, K., Spielmann, T., Gilberger, T. W. Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. **PLoS Pathog** 5:e1000322, 2009.
- Trottein, F., Triglia, T., Cowman, A. F. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. **Mol Biochem Parasitol** 74:129-141, 1995.
- Udhayakumar, V., Kariuki, S., Kolczack, M., Girma, M., Roberts, J. M., Oloo, A. J., Nahlen, B. L., Lal, A. A. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. **Am J Trop Med Hyg** 65:100-107, 2001.
- Urban, B. C., Cordery, D., Shafi, M. J., Bull, P. C., Newbold, C. I., Williams, T. N., Marsh, K. The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria. **Infect Immun** 74:6700-6706, 2006.
- Urban, B. C., Ferguson, D. J., Pain, A., Willcox, N., Plebanski, M., Austyn, J. M., Roberts, D. J. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature** 400:73-77, 1999.
- Urban, B. C., Mwangi, T., Ross, A., Kinyanjui, S., Mosobo, M., Kai, O., Lowe, B., Marsh, K., Roberts, D. J. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. **Blood** 98:2859-2861, 2001a.
- Urban, B. C., Roberts, D. J. Inhibition of T cell function during malaria: implications for immunology and vaccinology. **J Exp Med** 197:137-141, 2003.

- Urban, B. C., Willcox, N., Roberts, D. J. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 98:8750-8755, 2001b.
- van Hellemond, J. J., Rutten, M., Koelewijn, R., Zeeman, A. M., Verweij, J. J., Wismans, P. J., Kocken, C. H., van Genderen, P. J. Human Plasmodium knowlesi infection detected by rapid diagnostic tests for malaria. ***Emerg Infect Dis*** 15:1478-1480, 2009.
- Vichchathorn, P., Jenwithisuk, R., Leelaudomlipi, S., Tungpradabkul, S., Hongeng, S., Cui, L., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R. Induction of specific immune responses against the *Plasmodium vivax* liver-stage via in vitro activation by dendritic cells. ***Parasitol Int*** 55:187-193, 2006.
- Vigario, A. M., Gorgette, O., Dujardin, H. C., Cruz, T., Cazenave, P. A., Six, A., Bandeira, A., Pied, S. Regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. ***Int J Parasitol*** 37:963-973, 2007.
- von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. ***Nat Immunol*** 6:338-344, 2005.
- Walther, M., Jeffries, D., Finney, O. C., Njie, M., Ebonyi, A., Deininger, S., Lawrence, E., Ngwa-Amambua, A., Jayasooriya, S., Cheeseman, I. H., Gomez-Escobar, N., Okebe, J., Conway, D. J., Riley, E. M. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. ***PLoS Pathog*** 5:e1000364, 2009.
- Walther, M., Tongren, J. E., Andrews, L., Korbel, D., King, E., Fletcher, H., Andersen, R. F., Bejon, P., Thompson, F., Dunachie, S. J., Edele, F., de Souza, J. B., Sinden, R. E., Gilbert, S. C., Riley, E. M., Hill, A. V. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. ***Immunity*** 23:287-296, 2005.
- Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., Bluestone, J. A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. ***Immunity*** 1:405-413, 1994.
- Wastling, J. M., Xia, D., Sohal, A., Chaussepied, M., Pain, A., Langsley, G. Proteomes and transcriptomes of the Apicomplexa--where's the message? ***Int J Parasitol*** 39:135-143, 2009.
- Webster, D., Hill, A. V. Progress with new malaria vaccines. ***Bull World Health Organ*** 81:902-909, 2003.
- Weidanz, W. P. Malaria and alterations in immune reactivity. ***Br Med Bull*** 38:167-172, 1982.

- Wykes, M., Good, M. F. A case for whole-parasite malaria vaccines. *Int J Parasitol* 37:705-712, 2007a.
- Wykes, M., Keighley, C., Pinzon-Charry, A., Good, M. F. Dendritic cell biology during malaria. *Cell Microbiol* 9:300-305, 2007b.
- Wykes, M. N., Good, M. F. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat Rev Microbiol* 6:864-870, 2008.
- Wykes, M. N., Liu, X. Q., Beattie, L., Stanistic, D. I., Stacey, K. J., Smyth, M. J., Thomas, R., Good, M. F. Plasmodium strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. *PLoS Pathog* 3:e96, 2007c.
- Wykes, M. N., Liu, X. Q., Jiang, S., Hirunpetcharat, C., Good, M. F. Systemic tumor necrosis factor generated during lethal Plasmodium infections impairs dendritic cell function. *J Immunol* 179:3982-3987, 2007d.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., Sakaguchi, S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16:1643-1656, 2004.
- Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., Dong, C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282:9358-9363, 2007.