

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Fisiopatologia

Avaliação da resposta de anticorpos IgG contra diferentes variantes alélicas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária

Ana Caroline Barbosa de França

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Fisiopatologia

Avaliação da resposta de anticorpos IgG contra diferentes variantes alélicas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária

Ana Caroline Barbosa de França

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F815a	França, Ana Caroline Avaliação da resposta de anticorpos IgG contra diferentes variantes alélicas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de Plasmodium vivax em indivíduos de áreas endêmicas de malária / Ana Caroline França. - São Paulo, 2020. 89 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Soares, Irene 1. Malária. 2. Plasmodium vivax. 3. diversidade antigênica. I. T. II. Soares, Irene, orientador.
-------	---

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Irene da Silva Soares por me receber em seu laboratório, pela oportunidade de ingresso no Programa de Pós-Graduação e por toda a contribuição no desenvolvimento deste trabalho e na minha formação acadêmico-profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela disponibilização de sua infraestrutura e oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Professora Maristela Gomes da Cunha, da Universidade Federal do Pará, e a Dra. Marinete Póvoa, do Instituto Evandro Chagas, pelo fornecimento das mais de 600 amostras de soros humanos de áreas endêmicas de malária, fundamentais para o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos técnicos e orientandos do Bloco 17, pela disposição e auxílio, e às secretárias do Programa de Pós-Graduação, pela disponibilidade imbatível e todo o apoio necessário ao andamento do curso.

À Mestre e técnica do Laboratório de Parasitologia da FCF/USP, Kátia Sanches Françoso, por todo o auxílio e pela paciência com minhas dúvidas e imperícias ao longo do curso.

À Pós Doutoranda do Laboratório de Parasitologia Tarsila Mendes de Camargo, pelo apoio ao longo do curso e aos demais colegas, Professores e funcionários do Departamento, pela disponibilidade e receptividade.

Ao Professor Eduardo Lani Volpe da Silveira, não somente pelas contribuições prestadas durante o exame de qualificação e pelo convite à participação nos *Journal Clubs*; mas pela paciência, boa didática e contribuições valiosas oferecidas de forma sempre respeitosa, atenciosa, prestativa e dedicada.

À Rodolfo Ferreira Marques, Janaína Tenorio Novais e Alba Marina Gimenez, pela indescritível amizade, companheirismo e pelo apoio incondicional a mim e a este trabalho. Muito mais do que colegas de laboratório, vocês são meus presentes da Farmácia para a vida, que me ensinam todos os dias - cada um do seu jeito - a ser alguém melhor e mais competente, dentro e fora do laboratório.

À Victor Sanches Portella, minha lagosta. Até logo.

RESUMO

França, A. C. B.; Soares, I. S. Dissertação de Mestrado. **Avaliação da resposta de anticorpos IgG contra diferentes variantes alélicas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 87 p., 2020.

O *Plasmodium vivax* é a espécie com maior distribuição geográfica no mundo e a que predomina nas Américas, incluindo o Brasil. Comparado ao *Plasmodium falciparum*, poucas vacinas contra o *P. vivax* encontram-se em fase de testes clínicos. Um dos antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax* candidato a vacina é o Antígeno 1 de Membrana Apical (PvAMA-1). Entretanto, a diversidade antigênica do mesmo na natureza representa um grande desafio para seu uso no desenvolvimento de uma vacina de ampla cobertura. No presente estudo, avaliamos se os polimorfismos de sequências já descritos são capazes de influenciar na eficácia de uma vacina baseada em PvAMA-1. Para isso, geramos 9 proteínas recombinantes a partir da levedura *Pichia pastoris*, as quais são representativas de diferentes variantes alélicas do antígeno PvAMA-1, a saber: Belem, Chesson I, Sal-1, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS. Após expressão e purificação das proteínas selecionadas, avaliamos comparativamente por ELISA a resposta de anticorpos IgG naturalmente adquiridos em indivíduos expostos a malária, procedentes da Região Amazônica. Todas as proteínas foram obtidas com rendimento e pureza apropriados para os estudos propostos. A prevalência total de indivíduos expostos a malária com anticorpos contra PvAMA-1 Belem foi de 53,68%, em 611 amostras de soro testadas. Entre 100 das amostras sorologicamente positivas para PvAMA-1 Belem, os maiores valores de DO₄₉₂ foram obtidos para as variantes Chesson I, SK0814 e Sal-1, sugerindo que epítomos comuns ou de reatividade cruzada estão sendo reconhecidos nessas variantes. Por outro lado, níveis mais baixos de DO₄₉₂ foram obtidos para as variantes Indonesia XIX, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS, o que pode significar que essas variantes são menos prevalentes ou não circulam no Brasil. Soros policlonais de camundongos C57BL/6 previamente imunizados com PvAMA-1 Belem foram testados quanto ao reconhecimento das diferentes variantes por ELISA. Nossos resultados demonstraram que as variantes Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, Sal-1 e a proteína homóloga foram predominantemente reconhecidas. Por fim, ensaios de competição baseados em ELISA revelaram que as proteínas Chesson I, Indonesia XIX, SK0814 e Sal-1, na fase solúvel, foram capazes de inibir a ligação de anticorpos à variante Belem aderida a placa, sugerindo a presença de epítomos comuns ou de reatividade cruzada entre as mesmas. Nossos dados sugerem que uma vacina baseada na variante PvAMA-1 Belem gera anticorpos variante-transcendentes. Entretanto, para gerar uma vacina universal baseada em PvAMA-1, uma formulação multi-alélica, incluindo variantes da Tailândia e Papua Nova Guiné, deverão ser testadas.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium vivax*, diversidade antigênica.

ABSTRACT

França, A. C. B.; Soares, I. S. Master's Degree Dissertation. **Evaluation of IgG antibody response against different variants of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in individuals from malaria endemic areas.** School of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo. São Paulo. 87 pages, 2020.

Plasmodium vivax has the largest geographical distribution *Plasmodium* species in the world, and is predominant in the Americas, including Brazil. Fewer *P. vivax* vaccines than *P. falciparum* vaccines have successfully reached clinical trials. One of the candidate antigens for a blood-stage *P. vivax* vaccine is the apical membrane antigen 1 (PvAMA-1). However, the high natural variability found in this antigen presents a major challenge for its development into a wide-range vaccine. In the present study, we evaluated whether sequence polymorphisms would influence a vaccine based on PvAMA-1. To achieve this, we generated 9 recombinant proteins from the yeast *Pichia pastoris*, representative of different allelic variants of the PvAMA-1 antigen: Belem, Chesson I, Sal-1, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU, and PNG_68_MAS. After expression and purification of these proteins, we compared, by ELISA and IgG blocking, the natural acquired response from malaria-exposed individuals in the Amazon Region. All proteins selected had the appropriate yield and purity for the proposed studies. The total prevalence of malaria-exposed individuals with reactivity to PvAMA-1 Belem was 53,68%, from 611 serum samples tested. One hundred of these serologically positive samples were further tested against recombinant proteins representing the other allelic variants. The highest OD values resulted from Sal-1, Chesson I and SK0814 variants, suggesting that common epitopes or cross-reactivity exist across the variants. On the other hand, the lowest OD values resulted from the variants Indonesia XIX, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU, and PNG_68_MAS, which may mean these variants are less prevalent or do not circulate in Brazil. Polyclonal sera from C57BL/6 mice immunized with PvAMA-1 Belem were tested for recognition of different variants by ELISA. Our results showed that the variants Chesson I, Sal-1, Indonesia XIX, SK0814 and the homologous protein were predominantly recognized. Lastly, ELISA-based competition assays revealed that Chesson I, Sal-1, Indonesia XIX and SK0814 proteins were able to inhibit antibody binding to the Belem variant, suggesting the presence of common epitopes or cross-reactivity between these variants. Our data suggest that a vaccine based on the PvAMA-1 Belem variant displays strain-transcendent antibodies. However, to generate a universal vaccine based on PvAMA-1, a multiallelic formulation including variants from Thailand and Papua New Guinea must be tested

Keywords: Malaria, *Plasmodium vivax*, antigenic diversity.

I. INTRODUÇÃO	
1.1 Aspectos históricos da malária.....	3
1.2 Malária atualmente no mundo e no Brasil	4
1.3 Ciclo de vida do parasito	7
1.4 Estratégias de prevenção e controle	10
1.5 Estratégias vacinais contra a malária.....	12
1.6 Candidato vacinal PvAMA-1: estrutura, polimorfismo e antigenicidade	16
II. OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
III. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Genes selecionados para expressão na levedura <i>P. pastoris</i>	26
3.2 Obtenção das proteínas recombinantes a partir da expressão em <i>Pichia pastoris</i> ...	29
3.3 Purificação das proteínas recombinantes	29
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e <i>Western blot</i>	30
3.5 Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) das proteínas recombinantes	32
3.6 Comparação entre as sequências das proteínas recombinantes	32
3.7 Amostras de soros humanos	33
3.8 ELISA para comparação do reconhecimento imune das diferentes variantes de PvAMA-1 em soros humanos	34
3.9 Teste de imunogenicidade da variante de PvAMA-1 Belem em camundongos	35
3.10 ELISA de competição com múltiplos antígenos	36
3.11 Análises estatísticas e cálculo do Índice de Reatividade (IR)	37
IV. RESULTADOS	
4.1 Expressão e purificação das variantes de PvAMA-1	39
4.2 Reconhecimento das proteínas por anticorpo específico anti-AMA1-DII-K ₂₄₃	43
4.3 Comparativo de estruturas determinadas por software de predição molecular	44
4.4 Comparação da resposta de anticorpos IgG contra as variantes de PvAMA-1 em indivíduos expostos à malária	46
4.5 Imunogenicidade da variante PvAMA-1 Belem em camundongos e análise da reatividade cruzada entre as diferentes variantes.....	51
V. DISCUSSÃO	54
VI. CONCLUSÕES	61
VII. REFERÊNCIAS	63

Figura 1. Mapa das regiões de risco para malária no mundo	4
Figura 2. Mapa das regiões de risco para malária em território brasileiro.....	5
Figura 3. Ciclo do <i>Plasmodium</i> spp.....	8
Figura 4. O estágio sanguíneo do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp	8
Figura 5. Localização da proteína AMA-1 no merozoíta de <i>Plasmodium</i> spp.....	16
Figura 6. Estrutura cristalográfica e representação esquemática da PvAMA-1.....	17
Figura 7. Mapa do plasmídeo pPIC9K.....	26
Figura 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondentes as diferentes formas alélicas da proteína PvAMA-1	27
Figura 9. Representação esquemática da PvAMA-1 em suas variantes Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG68_MAS, em comparação com a cepa Belem.	32
Figura 10. Esquema de imunização realizado para obtenção das amostras de soros de camundongos.....	35
Figura 11. Análise da expressão das proteínas Belem, Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS por SDS-PAGE após purificação.....	38
Figura 12. Cromatogramas representativos das etapas de A. Cromatografia por afinidade e B. Cromatografia por troca iônica.....	39
Figura 13. Cromatogramas da etapa de RP-HPLC das variantes	40
Figura 14. Avaliação da expressão das variantes de PvAMA-1 (96 horas) em sobrenadante de culturas de <i>P. pastoris</i> por <i>Western blot</i>	41
Figura 15. Estrutura da proteína PvAMA-1 na forma alélica Belem, originada em software de estruturação molecular	42
Figura 16. Estruturas das 8 variantes expressas da proteína PvAMA-1, originadas em software de predição e estruturação molecular	43
Figura 17. Comparação da resposta de anticorpos IgG contra a proteína recombinante PvAMA-1 Belem em indivíduos expostos à malária e índice de reatividade dos indivíduos agrupados por episódios prévios de malária	45
Figura 18. Heatmap de magnitude de anticorpos e análise de correlação de amostras de 100 indivíduos sorologicamente positivos para a proteína PvAMA-1 Belem, em comparação com as demais variantes.....	46
Figura 19. Heatmap de magnitude e análise de correlação de anticorpos em 50 amostras de indivíduos sorologicamente negativos para a proteína PvAMA-1 Belem, em comparação com as demais variantes.	47
Figura 20. A. Resposta contra as variantes estudadas em 150 indivíduos previamente testados para a cepa Belem	48

Figura 21. Reconhecimento das demais variantes por anticorpos anti-PvAMA-1 Belem.....49

Figura 22. Porcentagem de respondedores para as demais variantes em comparação com PvAMA-1 Belem.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vacinas de estágio sanguíneo de <i>Plasmodium</i> spp. que tiveram sua eficácia testada no homem.....	12
Tabela 2. Número de acesso das variantes no banco de dados Genbank®	26
Tabela 3. Alinhamento das sequências de aminoácidos das variantes da PvAMA-1.....	32
Tabela 4. Rendimento final das proteínas recombinantes.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AMA-1: Antígeno 1 de Membrana Apical
ANOVA: Análise de Variância
BMGY: *Buffered Medium Glycerol complex for Yeast*
BMMY: *Buffered Medium Methanol complex for Yeast*
BSA: Albumina sérica bovina
DBP: *Duffy Binding Protein*
DI: Domínio I da proteína AMA-1
DII: Domínio II
DIII: Domínio III....
DO: Densidade óptica
DP: Desvio Padrão
EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*
G6PD: Glucose-6-fosfato desidrogenase
GLA: Emulsão estável ao adjuvante lipídico glucopiranosil
Ig: Imunoglobulina
II: Índice de infestação
MPLA: Monofosforil Lipídio A
MSP: Proteína de Superfície do Merozoíta
MVA: *modified vaccinia virus Ankara*
MVA: *modified vaccinia virus* Ankara.
OPD: *o-Phenylenediamine*
PBS: Solução salina tamponada com fosfatos
Pv25: *Plasmodium vivax antigen 25*.
QS21: Fração 21 Saponina purificada
RESA: proteína fusionada dos alelos FCQ-27 e PNG.
Rpm: Rotações por minutos
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SERA-5: *anti-serine repeat antigen 5*
TEMED: N,N,N',N' tetrametil etilenodiamida
TPI: Tratamento Preventivo Intermitente
Tris: Hidroximetilaminometano
WHO: World Health Organization
YPD: *Yeast extract – Peptone – Dextrose*

I. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos da malária

Muito antes dos primeiros homínídeos habitarem regiões de clima temperado, mosquitos do gênero *Anopheles* - responsáveis pela transmissão da malária – já viviam nestas áreas (SCHLAGENHAUF, 2004). Apesar de não haver um consenso sobre o período exato de surgimento da doença, acredita-se que ela foi a mais expressiva causa de morte entre os primatas antecessores do *Homo sapiens* (BRUCHE-CHWATT, 1988). Quanto à origem geográfica, a maior parte dos primeiros casos conhecidos foi documentada na África, em regiões próximas a Etiópia (GUTIERREZ, 1981).

O grande número de viagens com viés explorador, crescente com a população humana, colaborou muito para a disseminação da doença. No geral ocorreram muito menos casos na Europa em comparação com outras regiões do Velho Mundo, fato creditado principalmente à falta de resistência do vetor europeu às baixas temperaturas. Este é o principal motivo de casos de *Plasmodium* ocorrerem majoritariamente em regiões de clima temperado (BRUCE-CHWATT, 1965).

O fisiologista grego Hipócrates foi pioneiro em estabelecer uma conexão entre a proximidade de poços de água parada e a ocorrência de febres na população local. Posteriormente, os romanos também fizeram essa associação, constituindo-se como os precursores de um método preventivo: drenar os pântanos para evitar o acúmulo de água e, conseqüentemente, a reprodução do vetor. O termo "malária" surgiu justamente dessa relação entre a ocorrência da doença e a proximidade com os pântanos; os italianos, no século XIV, criaram o termo *mal'aria* (ar ruim), e os franceses originaram a expressão "paludismo", que vem de "pântano" (FRANÇA; DOS SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A origem do *Plasmodium falciparum*, espécie com o maior número de casos resultantes em morte, permanece em discussão. Contudo, a análise de aproximadamente 3.000 amostras fecais de macacos africanos identificou a presença do parasito apenas em gorilas ocidentais, apontando-os, portanto, como as fontes iniciais da malária humana nas regiões em que a espécie *Gorilla gorilla* está presente (PRUGNOLLE et al., 2011).

O *Plasmodium vivax* é ausente na maior parte da África Central devido à grande ocorrência do antígeno *Duffy*, uma mutação sanguínea que inibe a expressão de seu receptor. Credita-se a origem desta espécie de parasito, portanto, ao continente asiático (LIU et al., 2014). No entanto, ao realizar análises de sequência, Liu e

colaboradores defenderam que primatas não humanos em toda a África são infectados de forma endêmica com parasitos filogeneticamente muito próximos ao *P. vivax*, associando a origem da espécie justamente a partes da África (LIU et al., 2014).

1.2 Malária atualmente no mundo e no Brasil

A maior parte dos países africanos são áreas endêmicas de malária; além destes, países como a Índia, Coréia do Sul e China também são zonas de transmissão. O Brasil, a Armênia e a Argélia também possuem consideráveis níveis de transmissão, especialmente em se tratando de malária *vivax* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Embora 2018 tenha apresentado uma diminuição global no número de ocorrências da doença em relação a 2010, a tendência de aumento no número de casos se mantém desde 2015. Os dados divergem do ideal estabelecido pela WHO, que objetiva a queda de pelo menos 90% na incidência mundial de malária até 2030 (CHANDA et al., 2016).

Estima-se que em 2018 o número de casos mundiais de malária tenha diminuído somente 2% em comparação com o ano anterior, atingindo o expressivo número de 228 milhões de ocorrências anuais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). A doença ainda é muito presente em áreas tropicais, especialmente em regiões africanas – sendo, entre as enfermidades parasitárias, a maior causa de óbito entre as crianças africanas menores de 5 anos de idade. Calcula-se que mais de 3 bilhões de pessoas vivam em área de risco, considerando a região da África Tropical, América Central, ilhas da Oceania e outras regiões, conforme apresentado na Figura 1 (WHO, 2019).

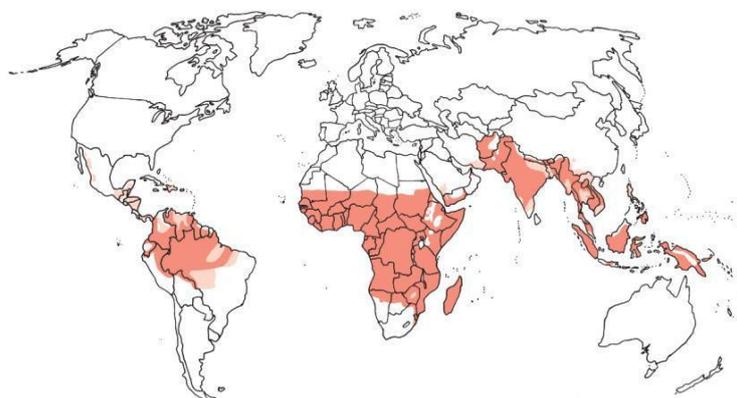


Figura 1. Mapa das regiões de risco para malária no mundo. Em coral, as regiões que são consideradas pela WHO como áreas de alto risco de transmissão ($II \geq 4$). As áreas coloridas com a nuance mais clara são de risco considerável (II de 1 a 3,9). II : Índice de Infestação. Adaptado de: International Association for Medical Assistance to Travellers, 2018. Disponível em: https://www.iamat.org/assets/images/IAMAT_MalariaChart_map_July2017_996x441.png. Acesso em 24 de outubro de 2019.

Dados da WHO (2018) representados na Figura 2 ainda apontam o Brasil como um dos países da América que obtiveram um aumento maior do que 20% no número de casos em comparação com 2016, além de ainda possuir uma região endêmica considerável.

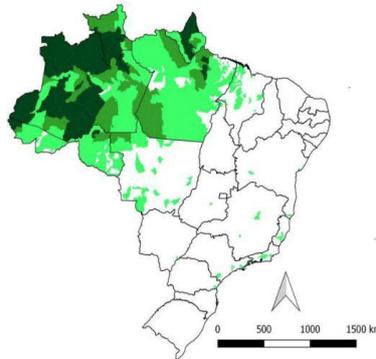


Figura 2. Mapa das regiões de risco para malária em território brasileiro. As áreas brancas não são consideradas zonas de risco. As verdes claras, tidas como locais de baixo risco. As intermediárias, consideradas regiões que apresentam médio risco. As de verde mais escuro, áreas de alto risco de transmissão. Adaptado de Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS, Ministério da Saúde Brasileiro, 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/16/Mapa-de-risco-mal-ria-2017.pdf>. Acesso em 13 de novembro de 2019.

Apesar de 99% dos casos anuais de malária no Brasil ocorrerem na região amazônica, outras áreas do país possuem elementos de um cenário ideal para a prevalência da doença; como por exemplo a presença do mosquito vetor, trânsito de turistas infectados sem ciência prévia das autoridades de saúde e condições ambientais favoráveis para a proliferação do vetor e consequente disseminação da doença (MARINHO-E-SILVA et al., 2018).

Quando estabelecida uma relação entre o número de mortes e o de casos, a malária *falciparum* é frequentemente considerada mais preocupante, uma vez que apresenta o maior número de mortes entre os casos de infecção. Contudo, a malária *vivax* é endêmica em diferentes regiões da América Central, alguns pontos da África e em grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil (KARNAD et al., 2018). Somente em 2018, 73% dos casos de malária nas Américas foram atribuídos ao *P. vivax*, que dentre os agentes etiológicos apresenta a maior distribuição geográfica e maior prevalência nas Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019; BAIRD, 2007). Anteriormente classificada como “benigna”, a malária *vivax* origina graves sintomas e, ocasionalmente, óbito (PRICE et al., 2009). No Brasil, já houve casos relatados de forma grave de malária *vivax* em indivíduos de áreas não endêmicas (DE PAULA et al., 2016), além de mais de 15 casos de infecção severa em pacientes equivocadamente diagnosticados com malária

falciparum (ALEXANDRE et al., 2010). Tais dados ilustram o fato de que a pesquisa em torno do *P. vivax* foi durante muito tempo negligenciada, resultando em um parco conhecimento acerca de sua biologia, patogenia e epidemiologia, quando comparada com o *P. falciparum* (GENTON et al., 2008; HUPALO et al., 2016). Esta é uma das razões pela qual o *P. vivax* é um relevante desafio no desenvolvimento de programas de erradicação da malária (GRIFFING et al., 2015).

1.3 Ciclo de vida do parasito

A malária humana pode ser causada por 7 diferentes agentes etiológicos, todos pertencentes ao gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e os mais recentemente classificados como agentes etiológicos humanos: *P. knowlesi* (KANTELE; JOKIRANTA, 2011), *P. cynomolgi* (Ta et al., 2014) e *P. simium* (BRASIL et al., 2017). Após o ciclo no hospedeiro invertebrado, a picada do mosquito do gênero *Anopheles* culmina na infecção do homem, através da inoculação de esporozoítos na corrente sanguínea, via vasos sanguíneos da derme (SOULARD et al., 2015). Apesar dos esporozoítos apresentarem motilidade suficiente para migrarem da derme para os vasos sanguíneos (HOPP et al., 2015), o próprio movimento do fluxo sanguíneo é a principal via de acesso para o endotélio do fígado. Uma vez no endotélio hepático, cerca de 70% dos parasitos migra de forma ativa para os hepatócitos (DOUGLAS et al., 2015; ROSAS et al., 2015). No interior das células hepáticas, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, que então se multiplicam por esquizogonia e dão origem a esquizontes teciduais, que contêm milhares de formas haplóides do parasito, denominadas merozoítos (ZHANG et al., 2016). As espécies *P. vivax* e *P. ovale* possuem ainda uma forma latente, que permanece no fígado e é denominada hipnozoíto. Ao fim do estado de latência, os hipnozoítos são responsáveis pela recorrência dos sintomas (DEMBÉLÉ et al., 2014; GURAL et al., 2018; MARKUS, 2015). Em geral, são descritos como formas uninucleares e muito pequenas quando comparadas aos outros estágios do parasito, e podem ainda permanecer por anos no organismo desde a infecção inicial (RIVERA et al., 2016).

A fase eritrocítica se inicia quando o merozoíto invade as células sanguíneas. Uma divergência importante entre o *P. vivax* e o *P. falciparum* ocorre justamente nesta etapa: enquanto o *P. falciparum* invade tanto as células maduras como as jovens, o *P. vivax* adentra somente os reticulócitos. Credita-se essa divergência às ligações ligante-receptor, embora tais mecanismos ainda precisem ser elucidados.

Sabe-se que, no processo de invasão de eritrócitos proteínas como o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) têm papel fundamental na reorientação e na própria inserção do parasito na célula sanguínea (MOON et al., 2016). Dentro dos eritrócitos, por esquizogonia, ocorre a formação de novos merozoítos que invadem novas hemácias (BAIRD et al., 2016). Alguns trofozoítos diferenciam-se em gametócitos femininos e masculinos, estágios sexuados que não sofrem divisão e seguem seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado. No mosquito, a fecundação entre macro-gametócito e micro-gametócito dá origem a forma de zigoto (MAIR et al., 2007). Em seguida, há a formação do oocineto e oocisto, nesta ordem. Ao final do processo, os esporozoítos permanecem armazenados nas glândulas salivares da fêmea e são transferidos para a derme do hospedeiro vertebrado, dando continuidade ao ciclo (PHILLIPS et al., 2017). O ciclo geral das espécies de *Plasmodium* é representado na Figura 3. Na Figura 4 está ilustrado o processo de invasão de eritrócitos pelo merozoíto.

A fase eritrocítica do ciclo do *P. falciparum* é a responsável pela chamada malária terçã, que reincide a cada 48 horas e normalmente causa sintomas mais expressivos, como febre e cefaleia intensa; a manifestação dos sintomas acontece a cada 48 horas em razão de estar relacionada com essa fase do ciclo. O *P. vivax* é o parasito responsável pela chamada febre terçã popularmente conhecida como “benigna”, tendo seu ciclo a mesma duração em horas, assim como a *P. ovale*, espécie restrita ao continente africano (PHILLIPS et al., 2017). De forma geral, o ciclo das espécies de *Plasmodium* é similar e dura de 48 a 72 horas, tendo o ciclo do *P. ovale* a maior duração (EBRAHIMZADEH; MUKHERJEE; RICHARD, 2017). Os sintomas são recorrentes a cada rompimento das hemácias pelos merozoítos. A fase aguda da doença caracteriza-se por um conjunto de paroxismos febris, que possuem períodos de frio, calor e suor. Na maior parte dos pacientes, os sintomas começam repentinamente, com período de frio que normalmente dura entre 15 e 60 minutos. Dentre os sintomas, estão o aumento de temperatura corporal, calafrios, cefaleia, náuseas e vômitos, fraqueza e cansaço constantes e icterícia em alguns casos (KÄLLANDER; NSUNGWA-SABIITI; PETERSON, 2004; SULEMAN et al., 2017; SECRETARIA DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 2018).

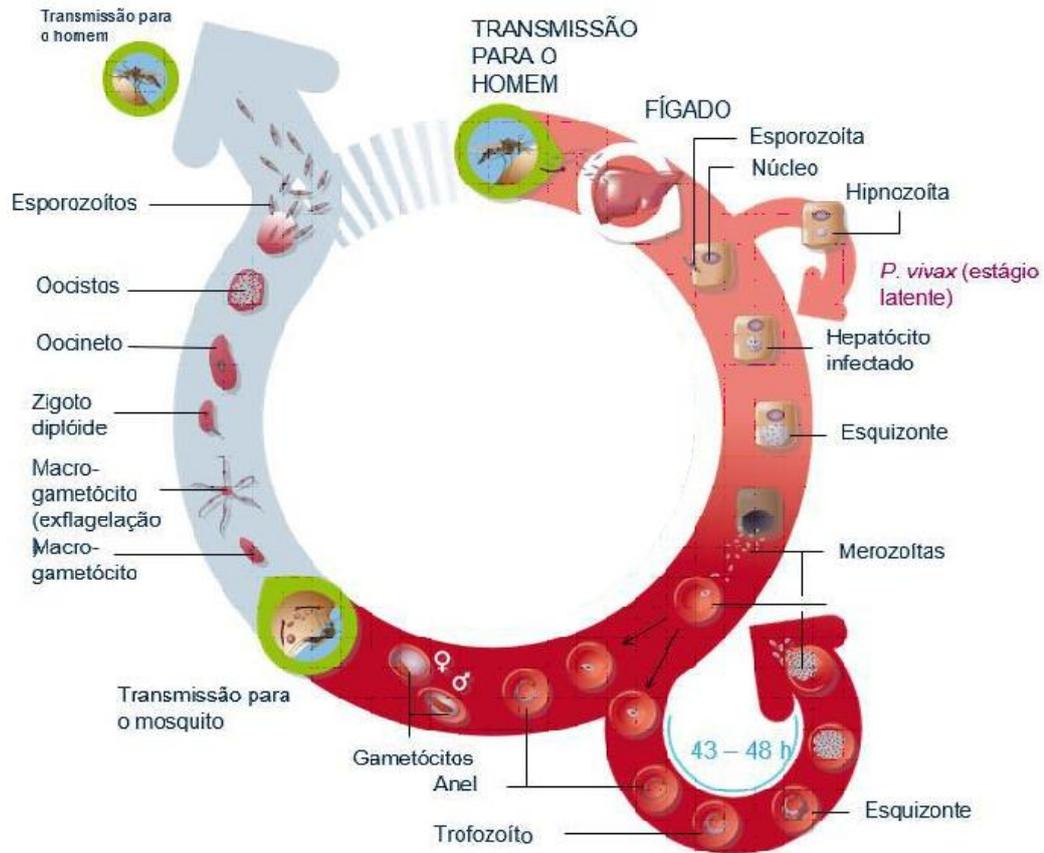


Figura 3. Ciclo do *Plasmodium* spp. Incluindo a fase latente do *P. vivax* e a invasão exclusivamente realizada em reticulócitos, diferente dos demais agentes causadores da malária, com exceção do *P. ovale*. Adaptado de Medicines for Malaria Venture. Disponível em: <https://www.mmv.org/newsroom/press-releases/one-step-closer-blocking-transmission-malaria>. Acesso em 30 de outubro de 2019.

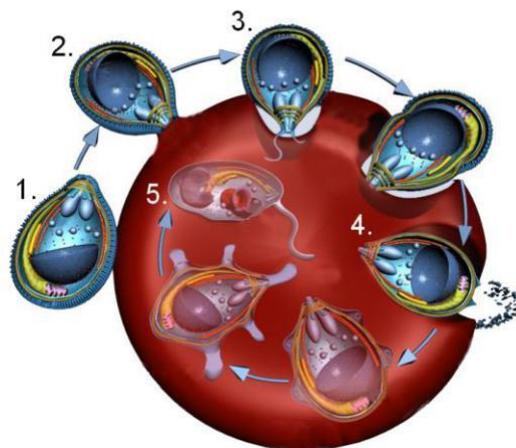


Figura 4. O estágio sanguíneo do ciclo de vida do *Plasmodium* spp. (1) A interação inicial merozoíto-eritrócito é determinada por reações moleculares específicas, entre os ligantes do parasito e os receptores da célula sanguínea. (2) Reorientação do parasito e formação do complexo de junção merozoíto-eritrócito. (3) Movimento interno impulsionado pelo complexo actina-miosina. (4) Projeção da membrana para a parte interna do eritrócito e inserção do revestimento de superfície. (5) Maturação morfogênica. Adaptado de QIAGEN, Erythrocyte Invasion by *Plasmodium* Merozoite. Disponível em: <https://www.malariasite.com/life-cycle/>. Acesso em 30 de outubro de 2019.

1.4 Estratégias de prevenção e controle

Considerando que os números de casos reportados de malária são significativos em âmbito mundial, é vital o desenvolvimento de estratégias de controle, tratamento e prevenção da doença (RICHE; SAUL, 2002; MAIR et al., 2007; BHATT et al., 2015). Estima-se ainda que nenhuma outra infecção parasitária tenha atingido a raça humana de forma tão ampla, uma vez que a malária tem influência até mesmo na evolução do genoma humano: é suposto que alterações originárias de polimorfismos genéticos conferiram proteção contra suas formas mais severas (PHILLIPS et al., 2015).

O diagnóstico inclui a identificação do parasito ou de seus antígenos no sangue do paciente. Apesar de parecer um procedimento muito simples, sua eficácia depende de muitos fatores, incluindo o conhecimento prévio das diferentes formas das espécies causadoras da doença em humanos e treinamento frequente e adequado, principalmente em regiões não endêmicas (TANGPUKDEE et al., 2009). Após o diagnóstico, são administrados antimaláricos por um período que varia de 3 a 14 dias. Normalmente, os fármacos utilizados são primaquina ou cloroquina, este último não mais utilizado para malária *falciparum* devido a ampla resistência desenvolvida pelo parasito (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, 2015). Para gestantes e crianças, uma estratégia de controle e prevenção comumente usada consiste em doses de antimaláricos com intervalos pré-determinados, buscando prevenir novas infecções em um mesmo paciente. Tal estratégia recebe o nome de TPI (Tratamento Preventivo Intermitente). Contudo, um dos fármacos mais indicados para esse tipo de estratégia - dihidroartemisinina-piperaquina - requer exames cardíacos frequentes, exigindo um maior empenho do paciente em prosseguir com o tratamento e tornando mais complexa a ministração correta da TPI (GUTMAN et al., 2017). Outros medicamentos antimaláricos, como a doxiciclina e a primaquina, são contra-indicados para gestantes (BAIRD et al., 2016; HEMINGWAY et al., 2016).

No tratamento da malária *vivax*, é importante considerar que o medicamento utilizado para tratar sua forma latente (primaquina) é contraindicado para pacientes com deficiência de G6PD (Glucose-6-fosfato dehidrogenase), condição de origem genética. Além disso, medicamentos preventivos possuem alto custo e requerem dosagem diária, como é o caso respectivamente da mefloquina e da atovaquona-proguanil (PRICE; NOSTEN, 2014).

Contudo, é importante observar que nos últimos tempos o aumento da resistência dos principais agentes etiológicos – incluindo o *P. vivax* e o *P. falciparum* – contra drogas antimaláricas tem aumentado consideravelmente (PEPLOW, 2016). O aumento da resistência aos principais medicamentos tem implicado na ocorrência da malária em novas

áreas, além da reemergência em locais onde anteriormente a doença foi considerada erradicada (ROCAMORA et al., 2018). Nos últimos anos, vários esforços foram direcionados para a descoberta de medicamentos antimaláricos, gerando um amplo portfólio de novos medicamentos (SIRAWARAPORN et al., 1997; ANTHONY et al., 2012; PHILLIPS et al., 2015). Para tentar driblar a crescente resistência do parasito a fármacos e seus compostos, novos tratamentos estão sendo desenvolvidos: à exemplo de terapias combinadas, envolvendo moléculas com um maior espectro de atividades que incluem desde tratamento da infecção no estágio sanguíneo até quimioprevenção dos estágios hepáticos (BAIRD et al., 2016).

Além do tratamento de pessoas já infectadas, o Manejo Integrado de Vetores (estratégia de erradicação da malária indicada pela WHO) inclui medidas de controle e prevenção da malária direcionados ao vetor da doença. A instalação de telas de proteção e a pulverização de inseticidas são as principais ações de combate ao mosquito, adotadas em pequena e média escala (SNOW et al., 1999; FOSTER; PHILLIPS, 1997). Mosquiteiros impregnados com inseticidas têm reduzido significativamente a transmissão de malária nos últimos anos, funcionando de forma expressiva, ocasionando uma diminuição da transmissão em cerca de 70% nas áreas em que o mosquito realiza a picada em locais fechados e durante o período noturno. No entanto, a mesma eficácia não é observada em regiões em que a maior parte das picadas ocorrem em locais externos ou no começo da noite: um exemplo destes locais é a América Latina (BINKA; AKWEONGO, 2006; OKELL; CHURCHER, 2016). Essas estratégias têm se tornado cada vez mais limitadas, uma vez que os mosquitos vetores têm se tornado mais resistentes também aos inseticidas (DIJANIC et al., 2018; BUTLER, 2011). No entanto, é preciso observar que o aumento da resistência do vetor aos inseticidas e dos parasitos aos antimaláricos são estratégias naturais de sobrevivência, portanto um aumento ainda maior destes mecanismos é previsto.

A ocorrência de mutações ou alterações metabólicas é comum em outras espécies de *Plasmodium*. Este mecanismo é uma antiga, bem estabelecida e amplamente estudada estratégia de sobrevivência de vetores, inclusive o *Anopheles*. Sendo assim, é necessário traçar outros meios de controle para que se consiga uma interação proveitosa entre os meios de combate à malária (HANOVER, 1975; KÄLLANDER; NSUNGWA-SABIITI; PETERSON, 2004; KISINZA et al., 2017; MESSENGER et al., 2017; SINGH; DWIVEDI; NATH, 2018).

Medidas direcionadas para a produção de vetores transgênicos também são estudadas e recentemente apresentaram bons resultados, impedindo a produção do cromossomo X e a consequente reprodução de mosquitos fêmeas (GALIZI et al., 2014). Entretanto, o impacto desconhecido da inserção de animais geneticamente modificados pode acarretar o surgimento de uma espécie ainda mais resistente e ser um processo mais lento do que o esperado (BILGO et al., 2017).

O desenvolvimento de uma vacina efetiva constituiria, então, uma importante ferramenta contra a doença, uma vez que apresentaria uma forma de prevenção de excelente custo benefício e eficácia, e ajudaria a driblar as estratégias para aumento da resistência - tanto do vetor como do parasito (NIKOLAEVA; DRAPER; BISWAS, 2015).

1.5 Estratégias vacinais contra a malária

O desenvolvimento de uma formulação vacinal pode ter como alvo uma das três fases de vida do *Plasmodium*: a vacina pode ter como objetivo bloquear a transmissão, inibir a fase pré-eritrocítica ou atuar no estágio sanguíneo (HEMINGWAY et al., 2016). As vacinas de bloqueio de transmissão atuam impedindo a infecção do mosquito, assim interrompendo também a disseminação da doença nas populações humanas (CHURCHER et al., 2017). As formulações direcionadas para o estágio pré-eritrocítico procuram evitar a infecção do hospedeiro vertebrado (MITCHELL et al., 1976). Por sua vez, as formulações que possuem como alvo a fase sanguínea visam evitar e controlar a parasitemia e, desta forma, prevenir ou minimizar as manifestações clínicas.

Em 2015, a primeira vacina contra a malária foi aprovada para implementação piloto em três países da África: Gana, Quênia e Malawi. Direcionada para a fase pré-eritrocítica, RTS,S/AS01 é desenvolvida pela GlaxoSmithKline® e inclui epítomos de células B e T (AMELIA et al., 2019). Sua composição é baseada na proteína circunsporozoíta de *P. falciparum* (CSP: 19 NANP repeats seguidos de um repeat de trombospondina) fusionada com a superfície do vírus da hepatite B e um adjuvante composto de MPLA (Monofosforil Lipídio A, uma forma não tóxica do LPS) e QS21 (saponina purificada) (AMELIA et al., 2019; ZHENG et al., 2019).

Em análise realizada em 6.000 crianças vacinadas em 7 diferentes países africanos, a RTS,S/AS01 induziu 56% de proteção contra o primeiro episódio de malária clínica, e apresentou 47% de eficácia contra a forma grave da doença (AGNANDJI et al., 2014).

Apesar do mecanismo de indução de resposta imune contido na RTS,S não estar ainda totalmente elucidado, acredita-se que ele consista principalmente na resposta de

anticorpos contra a porção central de *repeats* (SUN et al., 2003; MOORTHY; REED; SMITH, 2009; WHITE et al., 2013; CHAUDHURY et al., 2017), pois altos títulos de anticorpos contra esta região foram encontrados em indivíduos imunizados (WHITE et al., 2013). Atualmente procura-se aumentar a duração da eficácia da formulação, visto que dados recentes sugeriram uma longevidade de anticorpos específicos de menos de dois anos (WHITE et al., 2015; MIURA, 2016).

Alguns grupos de pesquisa acreditam que uma formulação vacinal que atinja somente o estágio pré-eritrocítico do parasito dificilmente conferirá proteção total contra a doença, dada a complexidade do ciclo do parasito (SALAMANCA et al., 2019; YUSUF et al., 2019). Por isso, o desenvolvimento de uma vacina para estágio sanguíneo deve continuar sendo reputado: a inibição da proliferação do parasito nos eritrócitos é fundamental para impedir a manifestação de sintomas (BOES et al., 2015; TEO et al., 2016). Ademais, uma vacina direcionada para os estágios sanguíneos pode prevenir a doença nos casos em que as medidas contra os estágios pré-eritrocíticos não forem efetivas (SCHMIDT; BUTLER; HARTY, 2009).

Entre os alvos de vacinas para fase sanguínea mais estudados, estão as proteínas de superfície de merozoíto, como a *Merozoite Surface Protein* (MSP1₁₉) e *Apical Membrane Antigen-1* (AMA-1). Contudo, somente vacinas contra *P. falciparum* chegaram a ensaios clínicos de fase II, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Principais vacinas de estágio sanguíneo de *Plasmodium* spp. que tiveram sua eficácia testada no homem. Vacinas direcionadas para mais de um estágio não foram incluídas, assim como os testes que não apresentaram segurança ou imunogenicidade consideradas significativa pelos autores.

Espécie	Fase	Antígeno(s)	Adjuvante/vírus	Resultados principais	Referência
<i>P. falciparum</i>	II	MSP1 + MSP2 + RESA	Montanide ISA 720	Sem proteção clínica, mas redução da cepa específica da MSP2 na infecção.	(GENTON et al., 2002)
<i>P. falciparum</i>	II	AMA-1	GSK AS02a	Sem proteção clínica, mas redução da cepa específica na infecção.	(THERA et al., 2011)

<i>P. falciparum</i>	II	AMA-1	GSK AS02a	Diminuição na parasitemia entre os dias 7-9 após desafio (n=10), quando comparado com o grupo controle (n=6).	(SPRING et al., 2009)
<i>P. falciparum</i>	I	MSP3	Hidróxido de alumínio	Redução significativa no risco de malária clínica: 1.2 (dose de 15ug) e 1.9 (dose de 30ug) de casos contra 5.3 no grupo controle	(SIRIMA; COUSENS; DRUILHE, 2011)
<i>P. falciparum</i>	I	SERA-5	Hidróxido de alumínio	Redução significativa no risco de malária (taxa de risco baixa - 0,26 - quando comparado ao grupo controle)	(PALACPAC et al., 2013)
<i>P. vivax</i>	I	DBP	GLA-SE	Altos títulos (Mediana geométrica = 4) de anticorpos IgG verificados em soros de indivíduos de área endêmica (n=36)	(SINGH; DWIVEDI; NATH, 2018)
<i>P. vivax</i>	I	DBP	MVA	Altos títulos (Mediana geométrica = 4) de anticorpos IgG verificados em soros de indivíduos após <i>boost</i> (n=36)	(PAYNE et al., 2017)
<i>P. vivax</i>	I	Pv25*	Hidróxido de alumínio	Altos títulos (800 unidades de medida) de anticorpos IgG verificados em soros de indivíduos de área endêmica (n=30)	(MALKIN et al., 2005)

Montanide ISA720, GSK AS02 e AS02A são adjuvantes. * bloqueio de transmissão

Um dos antígenos de fase sanguínea mais estudados para a produção de uma vacina contra *P. vivax* é a *Duffy Binding Protein* (DBP), uma proteína do micronema parasitário que liga o antígeno do grupo sanguíneo *Duffy* nos reticulócitos humanos, mediando a invasão por merozoítos de *P. vivax* (CHITNIS; SHARMA, 2008). Os primeiros resultados de testes clínicos de Fase I relataram altos títulos de anticorpos gerados em soros de indivíduos infectados no momento da coleta, de diferentes áreas endêmicas da Índia (SINGH; DWIVEDI; NATH, 2018), e indivíduos também saudáveis do Reino Unido apresentaram títulos de anticorpos consideráveis (demonstrando razões maiores do que 1:100, medidas por ELISA) já na primeira dose de uma imunização *prime-boost* heteróloga, contendo DBP e Ankara (MVA) (PAYNE et al., 2017). Ensaio *ex-vivo* estão em andamento para medir a função protetora de anticorpos e verificar a presença de anticorpos anti-PvDBP em pacientes de área endêmica da África (URUSOVA et al., 2019).

Com o foco em bloqueio de transmissão, uma vacina utilizando como antígenos duas proteínas (Pv25 e Pv28) expressas na superfície dos gametócitos induziram o reconhecimento por anticorpos. Tanto a Pv25 quanto a Pv28, expressas como proteínas recombinantes em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, induziram a atividade de anticorpos em camundongos e macacos (HISAEDA et al., 2000; RAMJANEE et al., 2007; LÓPEZ et al., 2017). Estes ensaios sucederam os estudos com uma proteína quimérica constituída da fusão de ambos antígenos, e que induziram títulos de anticorpos mais elevados do que os observados com as duas proteínas separadamente em camundongos imunizados (HISAEDA et al., 2000). No entanto, ainda são necessários testes de imunogenicidade e eficácia de formulações contendo Pv25 para elucidar o potencial vacinal destes antígenos (LÓPEZ et al., 2017).

1.6 Candidato vacinal PvAMA-1: estrutura, polimorfismo e antigenicidade

A AMA-1 é uma proteína transmembrana do tipo I presente no esquizonte e no esporozoíto do *Plasmodium* (SANDERS et al., 2005), se acumulando nos micronemas conforme esquematizado na Figura 5 (KÄLLANDER; NSUNGWA-SABIITI; PETERSON, 2004; BAI et al., 2005). Esta proteína é conservada entre os parasitos do filo *Apicomplexa*, e constituída por um ectodomínio onde cisteínas formam oito ligações dissulfeto. Essas ligações dobram a proteína em três domínios (D) principais: DI, DII e DIII (DONAHUE et al., 2000; TRIGLIA et al., 2000). Estruturas cristalográficas de PfAMA-1 e PvAMA-1 mostraram que os domínios centrais I e II (Figura 6) fazem parte de uma superfamília de

proteínas que compõem um sistema de dobramento para invasão da célula hospedeira (BAI et al., 2005; PIZARRO et al., 2005).

A funcionalidade da AMA-1 é atribuída especialmente ao processo de invasão dos eritrócitos ou reticulócitos, através da junção com o aglomerado RON (composto de RON2, RON4 e RON5) formando o complexo *moving junction*: uma ponte entre a membrana da célula sanguínea e AMA-1 é formada assim que é feita a ligação com a RON2, enquanto RON4 e RON5 estão inseridas na membrana da célula do hospedeiro. Quando a AMA-1 é ligada através do citoplasma ao motor de actomiosina, o parasito é impulsionado para dentro do eritrócito ou reticulócito ao mesmo tempo em que seu conteúdo lipídico é liberado, formando o vacúolo parasitóforo, no qual o parasito se insere. Este processo de invasão completo é muito breve, dependendo essencialmente da lise dos ectodomínios da AMA-1 e da concomitante liberação de fragmentos solúveis (DUTTA et al., 2013; COWMAN et al., 2016; DELGADILLO et al., 2016; SALGADO-MEJIAS et al., 2019)

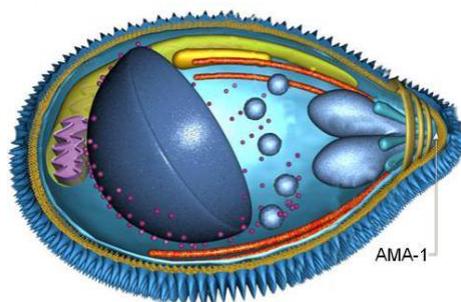


Figura 5. Localização da proteína AMA-1 no merozoíto de *Plasmodium spp.* Representação da localização da proteína AMA-1, nas espécies pertencentes ao gênero *Plasmodium*: porção apical do parasito, no micronema, e direcionada para reorientação no processo de invasão das células sanguíneas. A formação do complexo AMA-1 e RON2 possibilita o processo de entrada nas hemácias. Adaptado de QIAGEN, Structure of *Plasmodium* Merozoite. Disponível em: <https://blogs.biomedcentral.com/bugbitten/2018/01/19/vivax-malaria-another-key-red-blood-cell-invasion/>. Acesso em 12 de novembro de 2019.

Outro fator que deve ser considerado em um antígeno candidato a vacina, como a AMA-1, é a diversidade do gene que a codifica. Embora grande parte das proteínas encontradas nos diferentes estágios do gênero *Plasmodium* sejam essencialmente monomórficas - isto é, não apresentem grande diversidade gênica - ferramentas moleculares utilizadas por epidemiologistas apontam que a AMA-1 faz parte de um possível processo adaptativo, resultante em regiões altamente polimórficas (BARRY, 2005; QUANG et al., 2009). Diversos trabalhos descrevem o polimorfismo de genes que codificam a AMA-1 em diferentes isolados naturais de *P. vivax* (REMARQUE et al., 2008; ARNOTT et al., 2013). A presença de polimorfismo em genes que codificam uma proteína pode comprometer a

eficácia de uma vacina que a utiliza como base, uma vez que é possível que existam regiões de epítipo justamente nas áreas polimórficas (LO et al., 2018; OUATTARA et al., 2018). Os Domínios I e II de AMA-1 compartilham uma topologia central comum, constituída por um par de domínios intimamente associados (BAI et al., 2005). Os *loops* de DI e DII se estendem destes domínios associados para formarem uma fenda hidrofóbica longa, local de forte interação com o ligante altamente conservado (BAI et al., 2005; COLEY et al., 2007). Portanto, é suposto que as estruturas de *loop* altamente polimórficas acarretam em um mascaramento conformacional (A. MACRAILD et al., 2011; VULLIEZ-LE NORMAND et al., 2012), protegendo o local de interação da resposta dos anticorpos do hospedeiro (A. MACRAILD et al., 2011).

Analisando os aminoácidos polimórficos da PvAMA-1 em diferentes faixas etárias infectadas, Nedaei e colaboradores trabalharam com 92 amostras de sangue do sul e sudeste iranianos. Mutações nucleotídicas foram encontradas em 49 locais e, com base na sequência de aminoácidos, foram detectados 30 locais variáveis. A distribuição etária dos casos de malária mostrou que a maioria dos pacientes tinha entre 10 e 30 anos. Os haplótipos do gráfico de dispersão por idade mostraram uma taxa de incidência crescente com a idade na infância, enquanto a incidência foi a mais baixa em pacientes com menos de cinco anos de idade. Contudo, algumas substituições foram relacionadas a determinados grupos etários, o que sugere que essas substituições podem ser responsáveis por manifestações clínicas dos sintomas em diferentes idades, provavelmente como resultado da pressão imune do hospedeiro (NEDAEI et al., 2017).

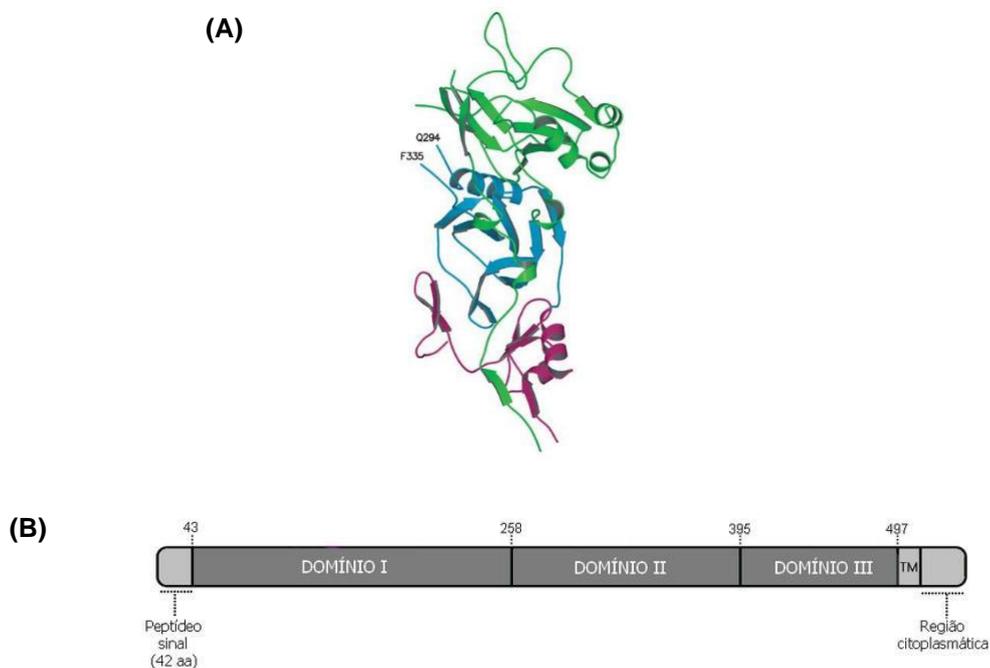


Figura 6. Estrutura cristalográfica e representação esquemática da PvAMA-1. (A) Estrutura cristalográfica da proteína AMA-1 de *P. vivax*. Os domínios I, II e III estão representados pelas cores: verde, azul e magenta, respectivamente. O domínio I é significativamente maior que os demais, corroborando a predição estrutural com base na contagem de aminoácidos presentes em cada domínio. Estruturação e representação: Pizarro et al., 2005. (B) Representação esquemática da proteína AMA-1 de *P. vivax*. A região transmembrana (TM), o peptídeo sinal e a região citoplasmática estão representada em cinza claro. O domínio I é composto de 216 aminoácidos, tendo início no de número 43 e final no 258, O domínio II contempla 137 aminoácidos, tendo início no de número 259 e final no de 395. O domínio III é o mais curto, com 102 aminoácidos: do 396 ao 497

Apesar dos estudos direcionados a PfAMA-1 serem mais numerosos, análises voltadas para a antigenicidade da AMA-1 de *P. vivax* também têm sido conduzidas ao longo dos anos, inclusive com contribuições do nosso grupo. Estudos imunoepidemiológicos demonstraram que o ectodomínio de *P. vivax* é altamente imunogênico em infecções naturais, especialmente em regiões com maiores níveis de transmissão e em indivíduos com infecções recentes (MORAIS et al., 2006; REMARQUE et al., 2008a; MUELLER et al., 2013). Ademais, anticorpos contra a proteína AMA-1 são capazes de inibir a invasão dos esporozoítos nos hepatócitos, além de impedir a reorientação do merozoíto para invasão dos eritrócitos ou reticulócitos (KENNEDY et al., 2002; REMARQUE et al., 2008a).

Rodrigues e colaboradores avaliaram a resposta imune naturalmente adquirida contra PvAMA-1 em 200 indivíduos de áreas endêmicas brasileiras: quatro diferentes cidades do Pará (Belém, Itaituba, Marabá e Tailândia), Porto Velho (Rondônia) e Serra do Navio (Amapá). A proteína recombinante His6-AMA-1 reagiu com 85,0% de anticorpos IgG e a

taxa de resposta demonstrou ser diretamente proporcional ao número de episódios prévios de malária, sendo de 100% em indivíduos com pelo menos quatro episódios anteriores. O sequenciamento parcial da região variável de 20 isolados brasileiros, inserida no Domínio I, confirmou o polimorfismo da PvAMA-1 sugerido nos resultados dos ensaios sorológicos, sugerindo uma diversidade gênica limitada no Brasil e uma alta imunogenicidade da proteína (RODRIGUES et al., 2005).

Posteriormente, a resposta imune contra PvAMA-1 foi avaliada em regiões endêmicas brasileiras com diferentes níveis de transmissão: Belém (Pará) e Cuiabá, Apiacás e Terra Nova do Norte (Mato Grosso), todas pertencentes a Região Amazônica. No local de maior endemicidade (Apiacás), a prevalência de anticorpos IgG foi mais alta (95%). Quanto à longevidade de anticorpos IgG, as porcentagens de respondedores em todas as regiões foram expressivas mesmo em indivíduos expostos brevemente à malária, inclusive após sete anos; esses resultados sugeriram um alto potencial imunogênico da PvAMA-1 (MORAIS et al., 2006).

Mais tarde, utilizando 220 amostras do Pará, Barbedo e colaboradores compararam a resposta de anticorpos a três proteínas recombinantes baseadas em PvAMA-1, PvMSP1₁₉ e PvDBP-RII. Em indivíduos infectados, a frequência de anticorpos IgG foi de 72,7, 95,0 e 44,5%, respectivamente, e os níveis de anticorpos específicos contra cada uma das proteínas não sofreram quedas significativas após nove meses. Tais resultados sugerem a regulação da resposta imune aos diferentes antígenos da fase sanguínea da malária, o que pode contribuir para reinfecções em indivíduos de área endêmica (BARBEDO et al., 2007).

Expressando os três domínios de PvAMA-1 separadamente e em duas diferentes combinações (DI-II e DII-III), um estudo de Múfalo et al. objetivou mapear os epítomos imunodominantes do ectodomínio da PvAMA-1. Para isso, 100 amostras de indivíduos de área endêmica (Região Amazônica Brasileira) foram testadas por ELISA. As proteínas recombinantes que continham o DII (DII, DI-II e DII-III) foram predominantemente reconhecidas (apresentando as respectivas porcentagens de respondedores: 65%, 60% e 59%). Ademais, a imunização de camundongos com o ectodomínio completo induziu altos títulos de anticorpos, predominantemente para proteínas contendo o DII (MÚFALO et al., 2008).

Considerando os resultados que sugeriram que o Domínio II é altamente imunogênico, Gentil e colaboradores testaram a indução de anticorpos contra uma proteína recombinante baseada no DII de PvAMA-1, imunizando camundongos com a proteína em

questão na presença de seis adjuvantes: Adjuvante Completo e Incompleto de Freund (CFA e IFA), hidróxido de alumínio, Quil A, saponina QS21, CpG-ODN 1826 e TiterMax. Os resultados corroboraram o estudo de 2008: o DII mostrou-se imunogênico quando ministrado em conjunto com qualquer um dos seis adjuvantes testados. Além disso, anticorpos anti-DII reconheceram a proteína PvAMA-1 nativa em isolados de pacientes de Manaus, região endêmica brasileira (GENTIL et al., 2010).

Para verificar a resposta de anticorpos contra o DII em indivíduos naturalmente infectados, foram realizadas análises da sequência primária de PvAMA-1 e a identificação de epítomos lineares de células B, tendo a sequência de aminoácidos 290-307 apresentado a maior antigenicidade. Com a hipótese de que este peptídeo sintético poderia possuir alta antigenicidade, soros de indivíduos infectados que conhecidamente continham anticorpos anti-PvAMA-1, anti-DII ou ambos foram testados. Apesar do peptídeo sintético ter induzido a atividade de anticorpos em todas as amostras de soro específicas para o Domínio II, os soros com reatividade exclusiva à versão completam representaram 58,3% das amostras. Os resultados então sugerem que um epítomo (SASDQPTQYEEEMTDYQK) contido no Domínio II é altamente antigênico durante infecções humanas naturais (BUENO et al., 2011).

Uma PvAMA-1 recombinante tendo como base a mesma sequência de aminoácidos foi expressa em *Pichia pastoris* e demonstrou alta taxa de indução de resposta em ensaios realizados com amostras sanguíneas de indivíduos naturalmente infectados, e induziu resposta imune em camundongos. Além disso, os anticorpos gerados pela vacinação reconheceram a proteína nativa de esquizontes maduros de isolados asiáticos de *P. vivax* (VICENTIN et al., 2014).

Objetivando primariamente elucidar os efeitos de uma infecção por malária que ocorre em conjunto com uma infecção parasitária, Sánchez-Arcila e colaboradores realizaram um trabalho em uma área brasileira endêmica para malária, no estado de Rondônia. Ao medir a indução de anticorpos IgG para PvAMA-1 e PvMSP1₁₉ nestes indivíduos, o grupo verificou uma prevalência de 74%. Além disso, a prevalência de anticorpos específicos foi similar para ambas as proteínas. Também foi observada uma resposta de anticorpos IgG reduzida para as duas proteínas em indivíduos com parasitos intestinais (SÁNCHEZ-ARCILA et al., 2015).

Anticorpos contra DBP, AMA-1 e PvMSP1₁₉ tiveram seus níveis monitorados após 9 anos em um estudo que avaliou o potencial destes marcadores sorológicos. O acompanhamento foi realizado em indivíduos adultos de área endêmica (floresta

amazônica). Os resultados sugeriram que o histórico imunológico da população em questão é um importante fator a ser considerado no que diz respeito a longevidade da resposta imune para todas as proteínas incluídas no estudo, uma vez que os anticorpos contra as proteínas se mostraram mais presentes em indivíduos recentemente expostos, enquanto anticorpos contra proteínas menos imunogênicas foram indicativos de imunidade naturalmente adquirida (PIRES et al., 2018).

Um outro trabalho mostrou que uma vacina contendo diferentes alelos da PvAMA-1 tem eficiência sob a diversidade alélica de forma mais satisfatória quando comparada a uma vacina que contenha somente um alelo da proteína, seguindo, portanto, o perfil antigênico da AMA-1 de *falciparum*. Os resultados demonstraram que anticorpos contra quatro diferentes alelos, quando combinados, inibem o desenvolvimento do parasito (DREW et al., 2012; DUTTA et al., 2013). Isso pode ser causado pela diluição da resposta específica gerada para cada alelo separadamente, enquanto a resposta contra regiões conservadas está em maior concentração por estar presente em todos os alelos. Isso sugere um favorecimento da resposta aos epítomos conservados (DUTTA et al., 2013).

Mais recentemente, nosso grupo produziu uma proteína quimérica (PvAMA1₆₆-PvMSP1₁₉) composta pelo ectodomínio de AMA-1 e pela região C-terminal da MSP-1 de *P. vivax*. Testes ELISA com essa proteína foram conduzidos utilizando soros de indivíduos infectados: PvAMA1₆₆, MSP1₁₉ e a proteína quimérica foram reconhecidas por, respectivamente: 73,0%, 91,9% e 91,0% destes soros (ROCHA et al., 2017).

Arnett e colaboradores avaliaram a diversidade gênica global da PvAMA-1, comparando a sequência gênica de proteínas originárias de duas diferentes regiões endêmicas da Papua Nova Guiné com dados previamente publicados de outras populações do parasito. Descrevendo um alto polimorfismo geograficamente estruturado, os autores discutem que um próximo e importante passo para dimensionar o potencial vacinal da PvAMA-1 seria uma etapa de testes funcionais de antigenicidade de haplótipos representativos, o que determinaria com maior especificidade quais os alelos essenciais na constituição de uma vacina baseada em PvAMA-1 (ARNOTT et al., 2013).

Objetivando diminuir essa lacuna na descrição do potencial vacinal da AMA-1, no presente trabalho analisamos a imunogenicidade de nove variantes alélicas baseadas na PvAMA-1, selecionadas a partir do estudo de 2013. Os alelos selecionados apresentam o maior número de polimorfismos regionais, sendo, portanto, representativos da região na qual foram encontrados. As variantes foram selecionadas com base no sequenciamento realizado, e são: Belem, Sal-1, Chesson I, SK0814, Indonesia XIX, TC103, PNG_05_ESP,

PNG_62_MU e PNG_68_MAS. Suas origens geográficas são, respectivamente: Brasil, Sudeste da Ásia, Coréia do Sul, Sudeste da África e Papua Nova Guiné. A caracterização bioquímica parcial e a verificação da resposta de anticorpos humanos, em conjunto com a análise da antigenicidade dessas proteínas, pode ser uma importante ferramenta no entendimento do potencial vacinal da AMA-1.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da diversidade antigênica do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *P. vivax* na indução de anticorpos IgG contra diferentes variantes alélicas, em indivíduos naturalmente expostos à malária vivax e em camundongos imunizados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Expressar e purificar as proteínas recombinantes Belem, Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS, representando diferentes formas alélicas de AMA-1 de *P. vivax*, a partir da levedura *Pichia pastoris*;
- ii) Avaliar a prevalência e magnitude de anticorpos IgG contra diferentes variantes de PvAMA-1 em soros humanos de áreas endêmicas de malária;
- iii) Avaliar a resposta imune induzida em camundongos após a vacinação com a variante PvAMA-1 Belem e estabelecer o grau de reatividade cruzada entre as demais variantes.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Genes selecionados para expressão na levedura *P. pastoris*

Os genes sintéticos que codificam as sequências PvAMA-1 em suas formas alélicas utilizadas foram construídos com base em sequências selecionadas a partir do estudo de população de PvAMA-1 (ARNOTT et al., 2013). Os genes selecionados para utilização no presente estudo estão descritos na Tabela 2. As alterações realizadas na sequência original foram realizadas para evitar n-glicosilação, e também foram descritas previamente pelo grupo.

Os genes sintéticos foram obtidos comercialmente (GenScript USA Inc[®], Piscataway, NJ), com códons otimizados para expressão em levedura *Pichia pastoris*. Em trabalho anterior desenvolvido pelo grupo, a MSc. Juliana Inês Branco utilizou a sequência de aminoácidos da proteína PvAMA-1 Sal-1 (Genbank XM_001615397) e a proteína yPvAMA-1 (Genbank KJ010958) previamente estudada em imunoenaios (VICENTIN et al., 2014). Em seguida, transformou cada plasmídeo em bactérias *E. coli* de linhagem DH5- α (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) a fim de se obter a expansão clonal. O DNA obtido por lise alcalina foi quantificado por análise espectrofotométrica em Nanodrop[®] (Thermo Fisher Scientific USA Inc.) e teve a integridade dos sítios enzimáticos confirmada por meio da análise de restrição utilizando as enzimas Sall, EcoRI e NotI (New England Biolabs USA). A integridade das sequências foi confirmada através de sequenciamento prévio realizado pela Genscript. As proteínas recombinantes possuem em seu interior o ectodomínio completo da PvAMA-1 (Domínios I, II e III) e a adição de uma cauda de hexa histidina na região C-terminal. Os genes otimizados correspondentes as novas proteínas PvAMA-1 foram subclonados no vetor pPIC9K (Invitrogen, Life Technologies, Corporation USA Inc.), ilustrado na Figura 7. Os genes foram denominados na seguinte e respectiva ordem: pPIC9K-PvAMA-1 Belem, pPIC9K-PvAMA-1 Sal-1, pPIC9K-PvAMA-1 Chesson I, pPIC9K-PvAMA-1 Indonesia XIX, pPIC9K-PvAMA-1 SK0814, pPIC9K-PvAMA TC103, pPIC9K-PvAMA-1 PNG_05_ESP, pPIC9K-PvAMA-1 PNG_62_MU e pPIC9K-PvAMA-1 PNG_68_MAS.

Todos os plasmídeos recombinantes já estavam disponíveis, e as proteínas foram produzidas conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo (VICENTIN et al., 2014). Para este trabalho, utilizamos os clones já selecionados anteriormente conforme descrito no parágrafo anterior.

Tabela 2. Códigos correspondentes as variantes no banco de dados Genbank®.

Gene	Código Genbank®
Belem	EU395595
Sal-1	XM_001615397
Chesson I	EU395596.1
Indonesia XIX	EU395598
SK0814	GU477788
TC103	ACY68751
PNG_05_ESP	KC702448.1
PNG_62_MU	KC702493.1
PNG_68_MAS	KC702496

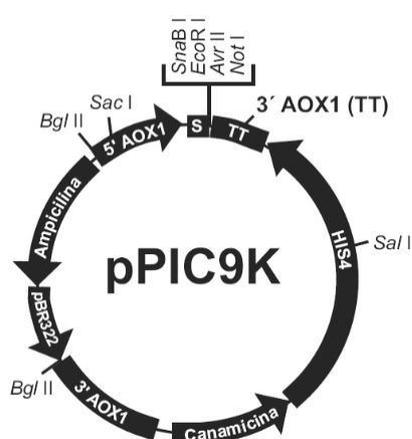


Figura 7. Mapa do plasmídeo pPIC9K. O pPIC9K foi usado em trabalho do grupo desenvolvido pela MSc. Juliana Inês Branco, como vetor para expressão secretada na levedura *P. pastoris*. Os genes foram clonados previamente dentro dos sítios de restrição EcoRI e NotI, para a expressão sob o controle do promotor AOX1, indutível por metanol. Leveduras da linhagem GS115 foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos linearizados, com as enzimas SalI (New England Biolabs™). As leveduras transformadas foram cultivadas em placas de meio deficiente em histidina, com o objetivo de selecionar clones recombinantes HIS⁺. A seleção de clones com inserções múltiplas foi feita em placas de meio YPD contendo geneticina, na concentração final de 0.25 a 4.0 mg/mL.

As proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris* apresentam as sequências primárias descritas na Figura 8. Antecedendo-as, há o peptídeo sinal a seguir (α -factor), composto por 42 aminoácidos para expressão secretada das proteínas:

¹ MNKIYYIIFLSAQCLVHIGKCGRNQKPSRLTRSANNVLEKG⁴²

	5	15	25	35	45	55	65
Belem	PTVERSTRMS	NPWKAFMEKY	DIERTHSSGV	RVDLGEDAIEV	ENAKYRIPAG	RCPVFGKGIV	IENSAVSFLK
Sal 1D.....R
ChessonT
IndonesiaD.....
SK0814R
TC103D.....
PNG_05_ESPT
PNG_62_MUK.....T
PNG_68_MASK.....D.....
	75	85	95	105	115	125	135
Belem	PVATGDQRLK	DGGFAFPNAN	DHISPMTLEN	LKARYKDNVE	MMKLNDIALC	RTHAASFVMA	GDQNSNYRHP
Sal 1K.....A.....E.....
ChessonK.DA.....E.....	T.....
IndonesiaIA.....
SK0814DA.....E.....
TC103
PNG_05_ESPS.....DIA.....
PNG_62_MUDIA.....
PNG_68_MASS.....K.D	N.....A.....E.....
	145	155	165	175	185	195	205
Belem	AVYDEKEKTC	HMLYLSAQEN	MGPRYCSFDA	QNRDAVFCFK	PKDESFENL	VYLSKNVRND	WDKKCPKRNK
Sal 1
Chesson
IndonesiaKE.....S.....NVD.....
SK0814K.....NVD.....
TC103
PNG_05_ESPKE.....S.....
PNG_62_MUKE.....S.....NVD.....
PNG_68_MASS.....NVD.....
	215	225	235	245	255	265	275
Belem	GNAKFGLWVD	GNCEEIPYVK	EVEAKDLREC	NRIVFEASAS	DQPTQYEEEM	TDYQIQGGF	RQNNREMIKS
Sal 1E.....G.....
Chesson
IndonesiaE.....G.....
SK0814G.....
TC103
PNG_05_ESPG.....
PNG_62_MUG.....
PNG_68_MASE.....G.....
	285	295	305	315	325	335	345
Belem	AFLPVGAFNS	DNFKSKGRGF	NWANFDSVKK	KCYIFNTKPT	CLINDKNFIA	TTALSHPREV	DLEFPCSIYK
Sal 1Q.....
ChessonQ.....R.....
IndonesiaP.....Q.....PQ.....
SK0814Q.....
TC103Q.....
PNG_05_ESPQ.....
PNG_62_MUQ.....P.....
PNG_68_MASQ.....R.....
	355	365	375	385	395	405	415
Belem	DEIEREIKKQ	SRNMNLYSVD	GERIVLPRIF	ISNDKESIKC	PCEPEHISQS	TCNFVVCNCV	EKRAEIKENN
Sal 1R.....
ChessonH.....
IndonesiaV.....G.....
SK0814R.....D.....
TC103
PNG_05_ESP
PNG_62_MU
PNG_68_MAS
	425	435	445				
Belem	QVVIKEEFRD	YYENGEEKSN	KQMLL				
Sal 1				
ChessonR.....				
Indonesia				
SK0814R.....				
TC103				
PNG_05_ESP				
PNG_62_MU				
PNG_68_MAS				

Figura 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondentes as diferentes formas alélicas da proteína PvAMA-1. As sequências foram alinhadas através da ferramenta bioinformática Seaview[®], utilizando o tipo de alinhamento Muscle (EDGAR; DRIVE; VALLEY, 2004). Em locais sinalizados com ponto, os aminoácidos são iguais aos encontrados na variante Belem.

A seleção de clones foi desenvolvida previamente a este trabalho, com inserções múltiplas feitas em placas de meio YPD (*Yeast extract – Peptone – Dextrose*) contendo geneticina (Sigma-Aldrich®) na concentração final de 0.25 a 4.0 mg/mL.

3.2 Obtenção das proteínas recombinantes da partir da expressão em *Pichia pastoris*

Inoculou-se uma colônia selecionada em placas de meio YPD Ágar em 1.000 mL de meio BMGY (*Buffered Medium Glycerol complex for Yeast*), [10 g de peptona Sigma-Aldrich®, 20 g de extrato de levedura Sigma-Aldrich® em 700 mL de água bidestilada, 10xGlicerol Affymetrix®, 50 mL de Yeast Nitrogen Base Sigma-Aldrich®, 50 mL de Tampão Fosfato pH=6 (8,7 g de Fosfato de potássio bibásico Sigma-Aldrich® em 50 mL de água bidestilada e 40,83 g de Fosfato de potássio monobásico Sigma-Aldrich® em 300 mL de água bidestilada, 1 mL de biotina Sigma-Aldrich® (20 mg em 100 mL de água bidestilada) em tubo cônico de volume de 50 mL, indicado para centrifugação em equipamento modelo 5810R Eppendorf®].

Em seguida, as colônias ficaram sob agitação constante de 230 rpm em equipamento de agitação modelo InforsHT™ Standard®, a 30°C por 24 horas, quando então foi feita a centrifugação (equipamento modelo 5810R Eppendorf®) a 3.000 rpm por 5 minutos a T.A. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 2.000 mL de BMMY (*Buffered Medium Metanol complex for Yeast*, preparado de forma semelhante ao meio BMGY previamente descrito, porém adicionando-se Metanol Merck® em substituição ao Glicerol). Após 24 horas, fora realizada a indução com 1% de metanol (Merck®), procedimento este repetido por mais 72 horas e sempre com o mesmo intervalo de tempo de 24 horas. Em seguida, cada cultura fora centrifugada e o sobrenadante recolhido e filtrado em membranas de 0,45 µm (Millex®HV) à bomba a vácuo (Edwards®). A identificação das proteínas foi feita em SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie™.

3.3 Purificação das proteínas recombinantes

As purificações das proteínas recombinantes envolvidas no projeto foram realizadas em 2 etapas cromatográficas, sendo estas respectivamente de afinidade e troca iônica. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à purificação por afinidade em coluna HisTrap™ FF (GE Healthcare® USA Inc., Pittsburgh, PA) acoplada ao sistema FPLC ÄKTA Prime™ Plus (GE Healthcare® USA Inc.). A eluição ocorreu contra um gradiente de imidazol (5400 mM de imidazol, USB, Affymetrix® USA Inc., Santa Clara, CA) em tampão

fosfato-cloreto [20 mM NaH₂PO₄ (Synth[®], Labsynth Produtos para Laboratórios BRA[®] Ltda.), [20 mM Na₂HPO₄ (Synth[®], Labsynth Produtos para Laboratórios BRA[®] Ltda.), 0,5 M NaCl (Synth[®], Labsynth Produtos para Laboratórios BRA[®] Ltda.), pH=6,0]. As frações contendo as proteínas recombinantes, identificadas em SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie[™], foram dialisadas em membrana SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing[™] 10.000 MWCO (Thermo Fisher Scientific[®] USA Inc., Waltham, MA) contra 20 mM Tris-HCl, (pH=8,0). Após a diálise, as proteínas foram filtradas (Millex[®]HV 0,45 µm) e submetidas a uma etapa de purificação por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna HiTrap[™] QFF (GE Healthcare[®] USA Inc.), também acoplada ao sistema ÄKTA[™]. A eluição das proteínas ocorreu com um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl em relação ao tampão 20 mM Tris-HCl (Invitrogen[™], Life Technologies Corporation[®] USA Inc.). As frações contendo a proteína recombinante quimérica foram então dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) [8 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, pH=7,4] 16-18 horas, sob constante agitação, a 4 °C.

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e Western blot

As eletroforeses foram realizadas de acordo com protocolos estabelecidos pelo grupo. Os géis de empilhamento foram obtidos utilizando 3% de acrilamida/bis-acrilamida, a partir das soluções estoque [12% (m/v) acrilamida (Invitrogen[™], Life Technologies Corporation[®] USA Inc.), 1,2% (m/v) bis-acrilamida (Invitrogen[™], Life Technologies Corporation[®] USA Inc.) e 0,25 mM Tris (Invitrogen[™], Life Technologies Corporation[®] USA Inc.), 0,2% (m/v) dodecil sulfato de sódio (SDS, Invitrogen[™], Life Technologies Corporation[®] USA Inc.)] e polimerizados utilizando 0,1% (m/v) de persulfato de amônio (Sigma-Aldrich[®] USA Co. LLC) e 12 µL de TEMED (Invitrogen[™], Life Technologies Corporation[®] USA Inc.) para 5 mL de solução final. Os géis de separação foram obtidos utilizando 12% de acrilamida/bis-acrilamida, a partir de soluções estoque [30% (m/v) acrilamida, 0,8% (m/v) bis-acrilamida e 0,75 mM Tris, 0,2% (m/v) SDS] e polimerizados utilizando 0,1% (m/v) de persulfato de amônio e 12 µL de TEMED para 9 mL de solução final. As eletroforeses foram realizadas a 120 V em solução tampão Tris-glicina [35 mM SDS, 160 mM glicina (Synth[™], Labsynth Produtos para Laboratórios BRA[®] Ltda.), 25 mM Tris-HCl)]. Os géis foram corados em

solução corante [1% (m/v) Coomassie™ blue R250 (USB Affymetrix™ USA Inc.), 45% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético (Synth™, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA® Ltda.)] e descorados com solução descorante [45% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético glacial]. As amostras foram preparadas em tampão de amostra [concentração final: 2,5% (m/v) glicerol, 4% (m/v)] SDS, 25 mM 2-mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories® USA Inc.), 12,5 mM Tris-HCl e 0,025 mM azul de bromofenol (Bio-Rad Laboratories® USA Inc.), e aquecidas a 97°C por 2 minutos.

A determinação da concentração das proteínas foi realizada por análise de predição, utilizando o software ImageQuant™ TL versão 8.1 (GE Healthcare® USA Inc.), utilizando como base comparativa uma curva de calibração com concentrações definidas de albumina de soro bovino (ASB, Invitrogen™, Life Technologies Corporation® USA Inc.).

Para o *Western blot*, proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12% conforme descrito anteriormente e, após esta, as amostras separadas no gel de acrilamida/bis-acrilamida foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose Hybond™N (GE Healthcare® USA Inc.) em tampão de transferência [160 mM glicina, 25 mM Tris e 20% (v/v) metanol] a 90 V por 30 minutos, utilizando o sistema de transferência semi-úmida Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories™ USA Inc.). As membranas foram coradas com solução Ponceau-S [0,1% Ponceau red (Bio-Rad Laboratories® USA Inc.) e 10% ácido acético] para confirmação da transferência, e em seguida foram incubadas por 16-18 horas, 4°C, em solução de bloqueio [5% (m/v) leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé™ CHE S.A., Vevey, VD), 2,5% (m/v) albumina sérica bovina] em PBS.

Após este período, as membranas foram incubadas por 1 hora a Temperatura Ambiente (T.A), com o anticorpo monoclonal anti-AMA1-DII-K243 na diluição de 1:2.000 (v/v), sob condições redutoras. Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS-T [0,05% Tween 20, (v/v), Invitrogen®, Life Technologies Corporation™ USA Inc.], a membrana foi incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (KPL®, Kirkegaard & Perry Laboratories™ USA Inc., Gaithersburg, MA) diluído 1:3.000 em solução de bloqueio por 1 hora a T.A. Após 3 lavagens com PBS-T foi feita revelação por quimioluminescência, utilizando kit ECL Western blotting Analyses System™ (Thermo Fishing Scientific™ USA Inc.) em leitor de imagem, utilizando-se as soluções de revelação e fixação (Eastman Kodak™ USA Co., Rochester, NY).

3.5 Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes purificadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC), usando uma coluna de modelo C4 Vydac (4,6 mm x 250 mm, para partículas de 300 Hm) acoplada em um sistema HPLC Shimadzu LC Solution™ (Shimadzu JPN Corp™., Kyoto, KY). O procedimento foi realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas. Utilizou-se um gradiente de acetonitrila (Merck™ KGaA DEU Inc.) de 0-100% em 0,1% de ácido trifluoracético (TFA, Thermo Fisher™ Scientific USA Inc.) / 90% acetonitrila a aproximadamente 24°C, sob um fluxo de 1 mL/minuto por 40 minutos. A eluição foi monitorada com um detector de absorvância UV-visível (Shimadzu SPD M20A™, Shimadzu JPN™ Corp.) a 214 nm (JIMENEZ et al., 2008).

3.6 Comparação entre as sequências das proteínas recombinantes

A representação esquemática das proteínas foi feita com auxílio do software PyMOL®, utilizando-se as sequências correspondentes a cada um dos alelos de acordo com o banco de dados Genbank™. As regiões destacadas tiveram como base a diferença de conformação de aminoácidos em relação ao alelo Belem, por ter sido isolado de um parasito do Brasil (VICENTIN et. al, 2014). As regiões de polimorfismo dos aminoácidos podem ser consultadas na Figura 9.

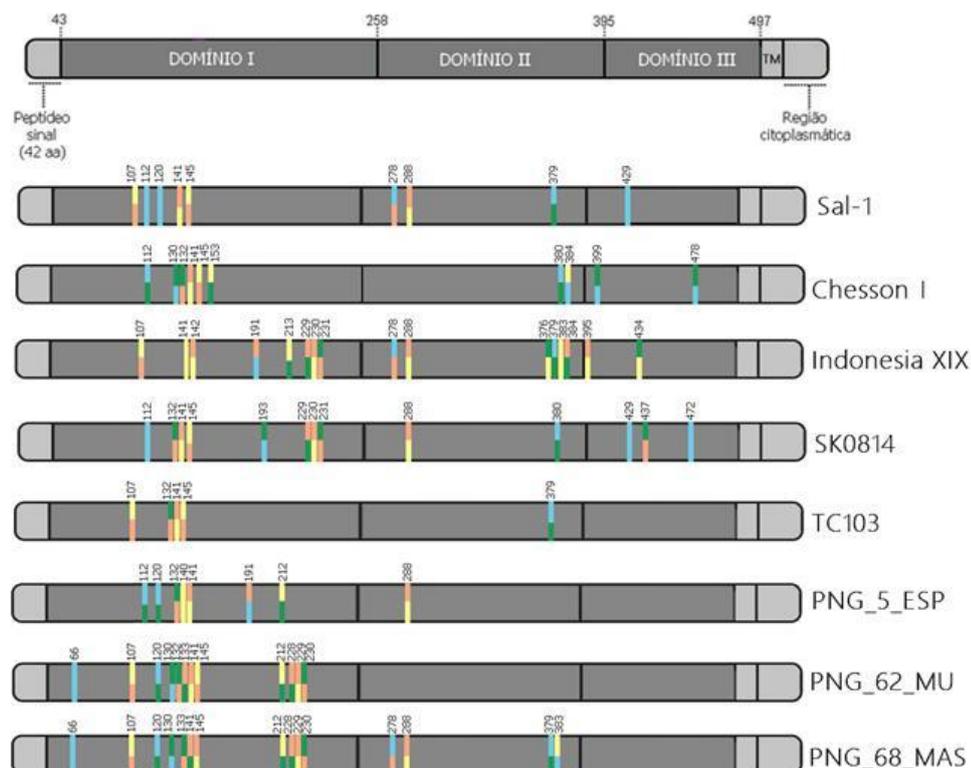


Figura 9. Representação esquemática da PvAMA-1 em suas variantes Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG68_MAS, em comparação com a cepa Belem. Representação esquemática das comparações nas sequências de aminoácidos da PvAMA-1 Belem com as demais variantes. As barras verticais inseridas em cada um dos domínios representam os aminoácidos que diferem da variante Belem, enquanto a cor da porção superior e inferior corresponde a classe do aminoácido encontrado na variante correspondente. As cores das classes dos aminoácidos estão representadas da seguinte forma: azul: alcalinos, amarelo: apolares, verde: polares e laranja: ácidos.

Tabela 3. Aminoácidos divergentes entre as variantes da proteína PvAMA-1.

	DI																	
	66	107	112	120	130	132	133	140	141	145	153	189	190	191	210	226	227	228
Belem	R	A	K	R	N	N	D	L	E	A	M	E	K	T	P	D	E	S
Sal-1	.	D	R	K	A	E
Chesson I	.	.	T	.	K	D	.	.	A	E	T
Indonesia XIX	.	D	I	A	.	.	K	E	.	S	N	V	D
SK0814	.	.	R	.	.	D	.	.	A	E	.	.	.	K	.	N	V	D
TC103	.	D
PNG_05_ESP	.	.	T	S	.	D	.	I	A	.	.	K	E	.	S	.	.	.
PNG_62_MU	K	.	T	.	.	D	.	I	A	.	.	K	E	.	S	N	V	D
PNG_68_MAS	K	D	.	S	K	D	N	.	A	E	.	.	.	S	N	V	D	.

Tabela contendo os aminoácidos do domínio I que divergem nas regiões especificadas na Figura 9. A sequência da tabela vem logo em seguida do peptídeo sinal especificado previamente. As cores colocadas em cada aminoácido refletem a classe à qual pertencem, sendo: amarela: polar, azul: alcalino, verde: apolar e laranja: ácido.

3.7 Amostras de soros humanos

Neste trabalho, 548 amostras são originárias de três localidades do Estado do Pará: Três Boeiras, localidades inseridas no município de Trairão (coordenadas: S 5°18' 55.21", W 55° 57' 0.01"), às margens da BR103; Ararandeuá (coordenadas: S 4°5' 1.78", W 48° 50' 6.68"), Rouxinol (coordenadas: S 03°41' 27.7" W 48°51'59.5") e Santa Paula (coordenadas: S 03°57' 11.7" W 48°58'32.7"), localidades inseridas no município de Goianésia do Pará; e Cotijuba (coordenadas: S 1° 27' 19.91" , W 48° 30' 9.03"), ilha pertencente ao município de Belém. Além destas, 63 amostras de indivíduos infectados foram coletadas no Instituto Evandro Chagas e cedidas pela Professora Dra. Maristela Gomes da Cunha e Dra. Marinete Póvoa, da Universidade Federal do Pará. As 548 amostras constituem uma coleta de linha de base (corte transversal) realizada nas áreas endêmicas mencionadas acima. A equipe da Dra. Maristela coordena projetos de pesquisa que têm por objetivo estudar diferentes aspectos da resposta imune em indivíduos naturalmente expostos à malária, bem como a epidemiologia da transmissão da doença. A utilização das amostras foi analisada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob protocolo de número CAE 3.198.871, em 14 de março de 2019 e possui parecer de aprovação nº 0030/2010, número CAE 0014.0.072.000-10, do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS. O grupo de amostras é composto de 311 indivíduos (50,90%) do sexo masculino, e 300 (49,10%) do sexo feminino, com idades entre 2 e 93 anos.

Todas as 611 amostras de soros foram armazenadas individualmente em microtubos (Eppendorfs®) 0.6 mL e refrigeradas em equipamento Electrolux™ (modelo FE18) até o momento de utilização. Um total de 533 destas amostras corresponde ao grupo de indivíduos não infectados, enquanto 78 compõem o grupo de infectados, pois 15 amostras da linha de base estavam positivas para *P. vivax*. O diagnóstico fora realizado pelo método de gota espessa no ato da coleta.

Vinte amostras de soro de indivíduos saudáveis, que nunca estiveram em área endêmica de malária, foram utilizadas para o cálculo do *cutoff* nos ensaios sorológicos. Essas amostras foram utilizadas em estudos prévios de nosso grupo (RODRIGUES et al., 2003, 2005; BARBEDO et al., 2007; MÚFALO et al., 2008).

O presente projeto fora submetido para apreciação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e ao Comitê de Ética da

Universidade Federal do Pará, via Plataforma Brasil. O número de registro do documento é 02201218.0.3001.0018.

3.8 ELISA para comparação do reconhecimento imune das diferentes variantes de PvAMA-1 em soros humanos

Alíquotas de 50 µL de cada proteína na concentração de 4 µg/mL foi adicionada às placas Costar high-binding[®] (Cód. 3590) de 96 poços. Após incubação durante a noite à T.A, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween 20[®] Sigma[™] e bloqueadas com uma solução de leite desnatado a 5% em PBS (PBS-leite), permanecendo nessas condições por 2 horas a 37°C. As amostras foram adicionadas em duplicata, poço por poço, na diluição de 1:100, seguida de nova incubação por 2 horas, em T.A. Após lavagem com PBS-Tween 20. Adicionou-se então 50 µL por poço da solução contendo conjugado peroxidase anti-IgG humano (Específico Fc; GE[®]) em diluição final de 1:80.000. A reação enzimática desenvolveu-se com uma solução de o-fenilenodiamina (1 mg/mL, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato (pH 5.0) e adição de peróxido de hidrogênio (0,03% [vol/vol]). A interrupção da reação enzimática se deu com a adição de 50 µL da solução a 4N de H₂SO₄. A densidade óptica foi medida a 492 nm (DO₄₉₂), utilizando uma leitora de microplacas (Thermo Scientific[®], modelo Thermo Electron 0Y). O cálculo do *cutoff* foi feito utilizando-se como base 3 desvios padrões (DP) sobre o valor da média das DO₄₉₂ de 20 indivíduos do Estado de São Paulo, nunca antes expostos a malária.

3.9 Teste de imunogenicidade da variante de PvAMA-1 Belem em camundongos

Os imunoenaios visando a avaliação da resposta de anticorpos IgG em animais foram realizados utilizando soros de camundongos previamente imunizados com PvAMA-1 Belem, em projeto anterior do grupo. Foram utilizadas fêmeas isogênicas de camundongos com idade de 6-8 semanas, linhagem C57BL/6, com peso entre 20-25 g e obtidos do biotério de experimentação da FCF/IQ-USP (Protocolo CEUA/FCF/520). Grupos experimentais compostos por 6 animais, receberam 3 doses de 10 µg de PvAMA-1 Belem na presença de 50 µL do adjuvante Poly (I:C), Invivogen[®]. O volume final de até 0,130 mL foi injetado com intervalo de 21 dias, sendo que no presente projeto foram utilizados soros originados da terceira sangria. O projeto anterior, do qual as amostras foram originadas, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/520). Os procedimentos foram realizados nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, em

ambiente adequado e com temperatura, luz e umidade controladas. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável, contendo maravilha estéril, mantida limpa através de trocas periódicas.

A Figura 10 apresenta o esquema de imunização utilizado, em que os intervalos das doses de proteína em conjunto com o adjuvante foram de 21 dias.

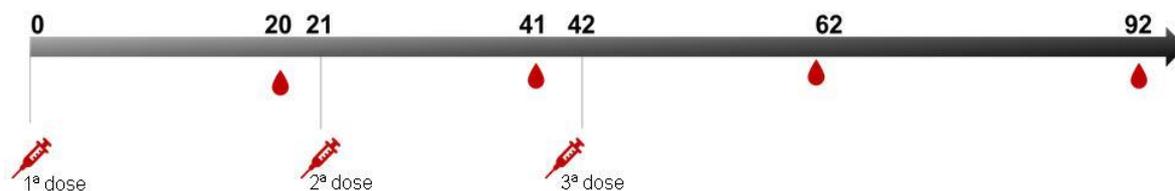


Figura 10. Esquema de imunização realizado para obtenção das amostras de soros de camundongos. Grupo de 6 camundongos C57BL/6, fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, foi imunizado com a variante Belem (10 µg) e adjuvante Poly (I:C) (50 µg). As imunizações foram realizadas durante o desenvolvimento do projeto da MSc. Juliana Inês Branco, e seguiram o cronograma acima descrito: a cada 20 dias, uma sangria foi realizada. No dia seguinte a cada sangria, foram ministradas as doses da formulação vacinal. No dia de número 62, realizou-se uma sangria para acompanhamento dos títulos de IgG, repetindo-se o processo no dia de número 92. Os camundongos utilizados foram cedidos e mantidos de acordo com o protocolo do biotério de experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para os testes ELISA, foram utilizados soros oriundos da última sangria.

Placas de 96 poços modelo High Binding Costar (Cód. 3590, Corning, Sigma-Aldrich USA Co.) foram sensibilizadas com 50 µL de cada uma das proteínas (=200 ng/poço), em tampão de carbonato-bicarbonato [Na₂CO₃ (0,01M), NaHCO₃ (0,03M), pH=9,6]. As placas foram incubadas 16-18 horas à T.A. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com solução PBS + 0,05% Tween 20 Sigma. Então, foram adicionados 200 µL/poço de solução PBS-Leite [leite desnatado 5% (m/v), PBS pH 7,4], durante o período de 2 horas à temperatura de 37°C para o bloqueio de sítios inespecíficos.

O soro obtido dos camundongos foi testado em diluição seriada, a partir de 1:100 em volume de 50 µL, seguido de incubação por 1 hora à T.A. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com solução PBS + 0,05% Tween 20. A cada poço, foram então adicionados 50 µL do anticorpo secundário anti-IgG camundongo conjugado a peroxidase (GE Healthcare®). Foi realizada a diluição 1:3.000 em solução PBS-Leite, durante o período de 1 hora à T.A. Posteriormente, as placas foram lavadas 5 vezes com solução PBS + 0,05% Tween 20. A reação enzimática desenvolveu-se conforme especificado no item 3.8.

3.10 ELISA de competição com múltiplos antígenos

Placas de 96 poços modelo High Binding Costar (Cód. 3590, Corning, Sigma-Aldrich USA Co.) foram sensibilizadas com 50 µg da variante PvAMA-1 Belem (=200 ng/poço), em tampão de carbonato-bicarbonato [Na₂CO₃ (0,01M), NaHCO₃ (0,03M), pH=9,6]. As placas foram incubadas 16-18 horas à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes com solução PBS + 0,05% Tween 20. Então, foram adicionados 200 µL/poço de solução PBS- Leite [leite desnatado 5% (m/v), PBS pH 7,4], durante o período de 2 horas à temperatura de 37°C para o bloqueio de sítios inespecíficos.

Em paralelo, o soro obtido dos camundongos foi pré-incubado durante 1 hora com cada uma das proteínas heterólogas na concentração final de 10 µg/mL, separadas em 3 grupos distintos: i) com porcentagem de inibição de anticorpos anti-PvAMA-1 Belem (verificada no ELISA de competição) igual ou menor que 48% ii) com porcentagem de inibição maior que 48% e iii) mix com todos os alelos, e colocado na placa na diluição 1:100 e em volume de 50 µL. Após 1 hora, as placas foram lavadas 5 vezes com solução PBS + 0,05% Tween 20. A cada poço, foram então adicionados 50 µL do anticorpo secundário anti-IgG camundongo conjugado a peroxidase (GE Healthcare). Foi realizada a diluição 1:3.000 em solução PBS-Leite, durante o período de 1 hora à 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 5 vezes com solução PBS + 0,05% Tween 20. A reação enzimática e o cálculo do *cutoff* desenvolveram-se conforme especificado no item 3.8.

3.11 Análises estatísticas e cálculo do Índice de Reatividade (IR)

O teste χ^2 foi utilizado para comparação das porcentagens de respondedores, utilizando o domínio de uso livre *VassarStats*. Os valores correspondentes aos índices de reatividade foram calculados individualmente, dividindo o valor da DO₄₉₂ pelo valor de *cutoff* de cada proteína. A comparação do IR entre os grupos, foi feita utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, também utilizado para comparação entre respostas de indivíduos saudáveis *versus* infectados para cada uma das variantes, e para o cálculo de significância entre a prevalência das amostras em relação à Belém.

Todos os valores, incluindo os de correlação determinados pelo teste de *Spearman*, foram feitos através do software GraphPadPrism 8.0.1.

O nível de significância foi estabelecido como $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Expressão e purificação das variantes de PvAMA-1

Essa etapa teve como finalidade a expressão e purificação das seguintes proteínas recombinantes, todas com base em variantes de PvAMA-1: Belem, Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS, com o objetivo de utilizá-las nos ensaios imunológicos propostos (a ordem de obedece a ordem cronológica de descrição das variantes na literatura). Uma proteína PvAMA-1 (variante Belem) foi utilizada como padrão para os experimentos, uma vez que já foi extensivamente estudada pelo nosso grupo (VICENTIN et al., 2014). A Figura 11 atesta a expressão das proteínas após 96 horas com suplementação de metanol a 1% a cada 24 horas. Após 96 horas, o nível de expressão foi satisfatório, apresentando o rendimento de expressão descrito na Tabela 4. As referidas proteínas possuem padrão de migração de 50-55 kDa, conforme observado anteriormente pelo grupo, e apresentaram poucos produtos de degradação visíveis. A presença de bandas inferiores às principais foi considerada característica do padrão de migração de cada alelo de PvAMA-1 quando analisado por SDS-PAGE, uma vez que houve a repetição do mesmo padrão em diferentes expressões.

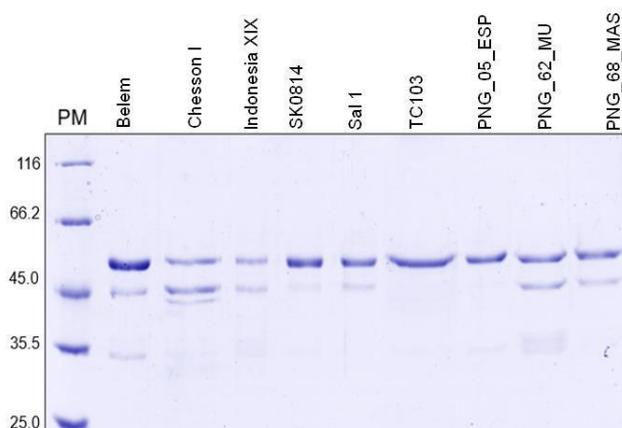


Figura 11. Avaliação da expressão das variantes de PvAMA-1 (96 horas) em sobrenadante de culturas de *P. pastoris*, em gel de poliácridamida. A avaliação foi realizada sob condições redutoras com 2-ME, em gel de poliácridamida, a 12% e após centrifugação a 2.600g. As alíquotas aplicadas possuem 16 μ L de cada proteína obtida após a filtração do sobrenadante da cultura, e um volume de 4 μ L de tampão de amostra para proteínas.

Ambas as etapas de purificação (cromatografia por afinidade e por troca iônica) são aplicadas com o objetivo de obter-se proteínas no mais alto grau de pureza possível, para que assim as mesmas possam ser utilizadas em imunoenaios. A Figura 12 apresenta os cromatogramas da variante Belem como exemplo de perfil de eluição. Os demais cromatogramas de afinidade e troca iônica podem ser consultados nos anexos I e II, respectivamente.

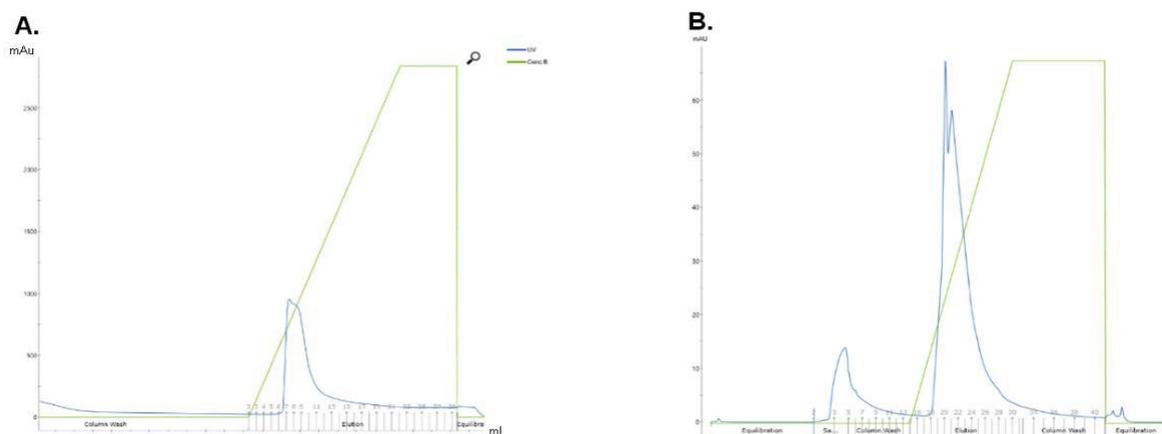


Figura 12. Cromatogramas representativos das etapas de A. Cromatografia por afinidade e B. Cromatografia por troca iônica. Para cromatografia de afinidade, o pico obtido para a variante Belem em mAu foi de 1.000, a partir da porcentagem de 26% de solução de eluição. Na cromatografia de afinidade, o perfil de eluição encontrado foi: 330 mAu de pico em 31% de solução de eluição. As imagens foram geradas automaticamente pelo software Unicorn, integrado ao equipamento ÄKTA Prime™ Plus.

Na cromatografia por afinidade, os picos apresentados em mAU (área de pico) se mostraram visíveis, alcançando índices satisfatórios (de 900 a 1500) em uma pequena área, o que certifica que as proteínas ficaram concentradas em um número reduzido de frações de eluição, tornando os processos seguintes de purificação mais efetivos. A taxa mínima de solução B para eluição das proteínas foi de 25 a 28%, conforme detalhado nas legendas das figuras correspondentes. Tal dado atesta que todos os alelos expressos apresentaram uma boa homogeneidade, já que não foi preciso uma grande quantidade de solução de eluição para que as proteínas fossem obtidas.

Na cromatografia de troca-iônica, índices também satisfatórios de mAu foram obtidos, variando de 100 a 330. A taxa mínima de solução B para eluição das proteínas variou de 25 a 32%. Novamente, os dados atestaram uma concentração e pureza satisfatória das proteínas obtidas.

Após as etapas de purificação, as proteínas tiveram sua pureza avaliada através do método de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (*Reverse Performance, High Performance Liquid Chromatography - RP-HPLC*). Este método, extremamente preciso e sensível, é capaz de detectar contaminantes presentes na amostra, independentemente de sua origem - uma purificação não eficiente ou produto de degradação das proteínas. Os cromatogramas da Figura 13 representam a avaliação do grau de pureza das amostras. Em todos, há um pico sobressalente que demonstra que as amostras se encontram puras e sem produtos de degradações a níveis detectáveis.

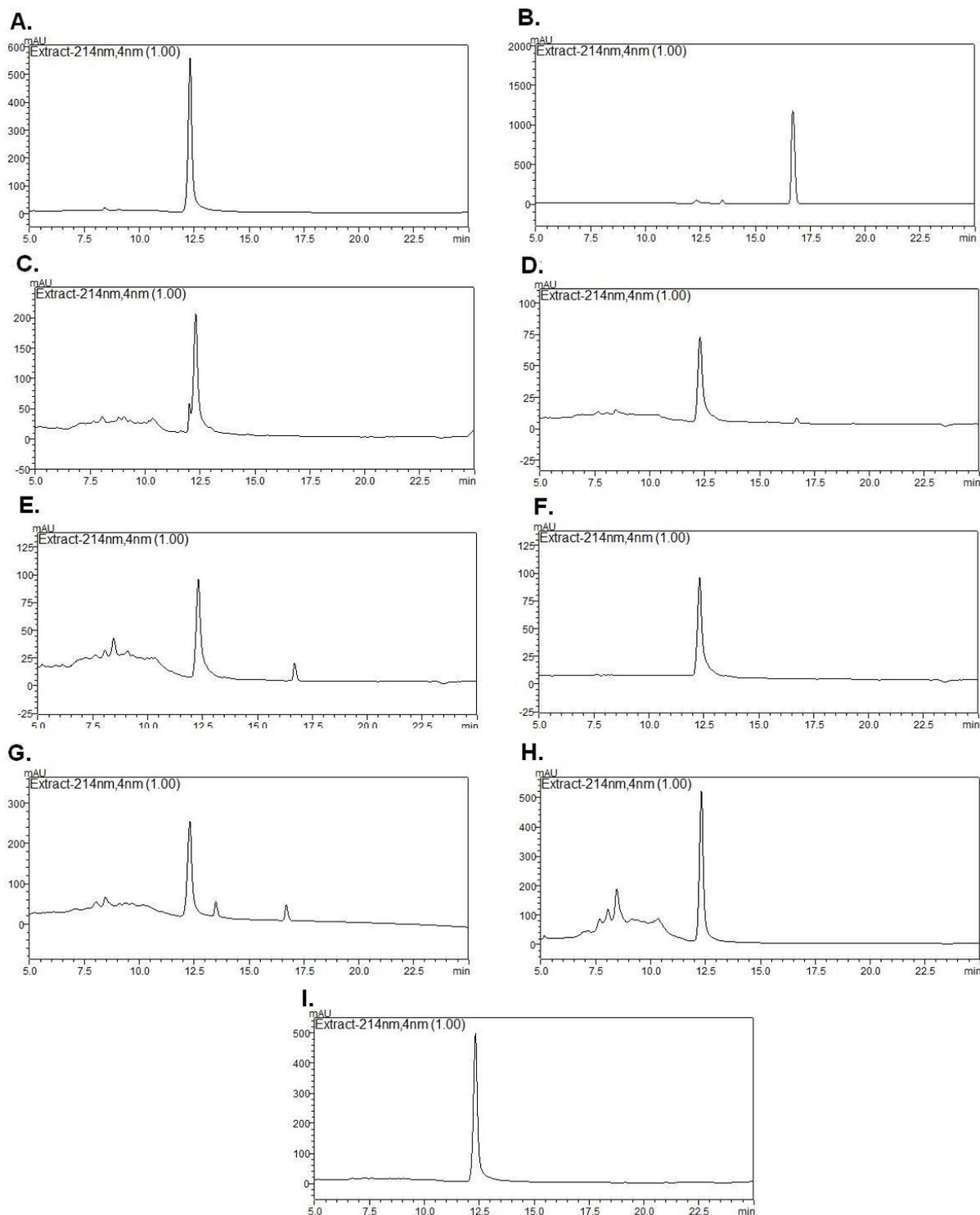


Figura 13. Cromatogramas da etapa de RP-HPLC das variantes. (A) Belem, (B) Sal-1, (C) Chesson I, (D) Indonesia XIX, (E) SK0814, (F) TC103, (G) PNG_05_ESP, (H) PNG_62_MU e (I) PNG_68_MAS. Gradiente de eluição combinando tampão “A” [TFA (0,1%) (v/v), água] e “B” [TFA (0,1 %) (v/v), acetonitrila (90%) (v/v)], a 24°C, 1 mL/minuto por 40 minutos, em uma coluna C4. Os picos de maior comprimento vertical são caracterizados como os picos correspondentes às variantes; os demais ruídos encontrados nos gráficos denotam degradação das amostras em grau leve, uma vez que possuem valores menores do que os picos definidos como das proteínas.

Tabela 4. Rendimento das proteínas recombinantes.

Variante	Concentração em µg/mL	Volume obtido em mL
Belem	532.39	8
Sal-1	274.53	12
Chesson I	113.36	6
Indonesia XIX	363.42	6
SK0814	296.57	7
TC103	93.58	12
PNG_05_ESP	223.73	7
PNG_62_MU	382.16	6
PNG_68_MAS	349.15	6

Após protocolos de expressão e purificação descritos anteriormente, foram obtidos os volumes e concentrações acima.

4.2 Reconhecimento das proteínas por anticorpo específico anti-AMA1-DII-K243

Os ensaios de *Western blot* foram realizados após a expressão em pequena escala de todas as proteínas recombinantes previamente citadas. Este ensaio teve como objetivo confirmar se as proteínas foram expressas em sua integridade. A Figura 14 atesta que os epítomos presentes no domínio II das proteínas recombinantes foram reconhecidos por anticorpos monoclonais (anti-AMA1-DII-K243). Com os resultados positivos, foi viável prosseguir com os imunoenaios descritos a seguir.

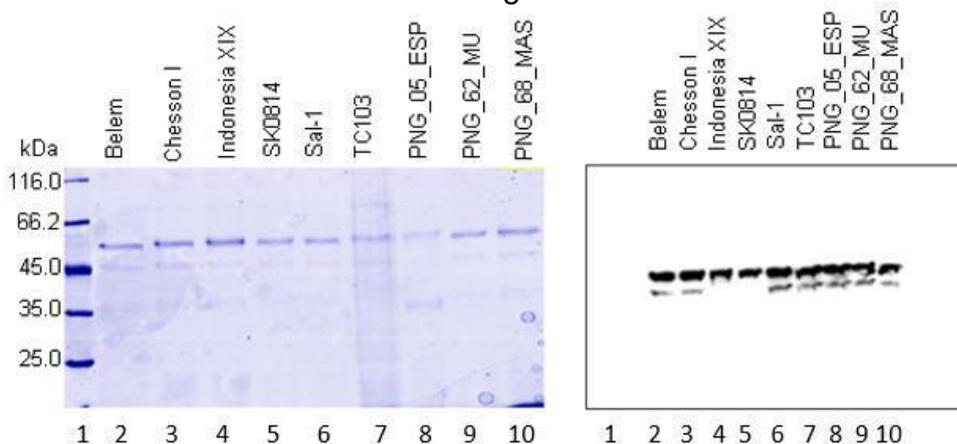


Figura 14. Análise da expressão das proteínas Belem, Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS por SDS-PAGE e *Western Blot*, após purificação. Para a análise, foram utilizados 1µg de cada proteína obtida após expressão das variantes em pequena escala. (A) SDS-PAGE 12%; 1: Marcador de massa molecular. Demais poços: variantes com massa molecular aproximada de 55kDa. (B) *Western blot* revelado conforme descrito no item 3.4. O poço de número 1 correspondem ao marcador de massa molecular.

4.3 Comparativo de estruturas determinadas por software de predição molecular

O PyMOL[®] é um sistema de predição e visualização molecular, que pode produzir imagens 3D de moléculas e macromoléculas biológicas. A versão do software licenciada para estudantes foi utilizada para estimar a similaridade entre os alelos das proteínas recombinantes utilizadas. A Figura 15 demonstra a estrutura molecular da forma alélica Belem. Destaca-se os três diferentes domínios da proteína, tendo como base a cristalografia e comparação da sequência de aminoácidos descritas anteriormente (PIZARRO et al., 2005).

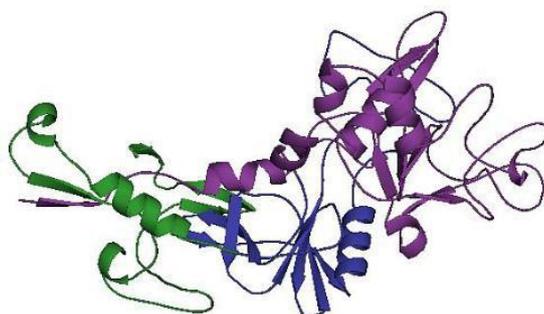


Figura 15. Estrutura da proteína PvAMA-1 na forma alélica Belem, originada em software de estruturação molecular. As cores representam os três diferentes domínios característicos da PvAMA-1, sendo a cor roxa representante do Domínio I, a cor azul representante do Domínio II e a cor verde representante do Domínio III. A estrutura e coloração foram feitas através do software PyMOL[®], utilizando como base a sequência de aminoácidos do banco de dados GenBank[™] e a definição de domínios previamente realizada por PIZARRO et al., 2005

A Figura 16 destaca as diferenças nos aminoácidos conformacionais das demais variantes em relação a Belem, detalhados na Tabela 3. Existe a hipótese de que estruturas polimórficas acarretem em mascaramento conformacional, impedindo ligações de resposta de anticorpos do hospedeiro (ARNOTT et al., 2013). Essa possibilidade foi melhor explorada nos imunoenaios, incluindo de reatividade cruzada de anticorpos, posteriormente detalhados.

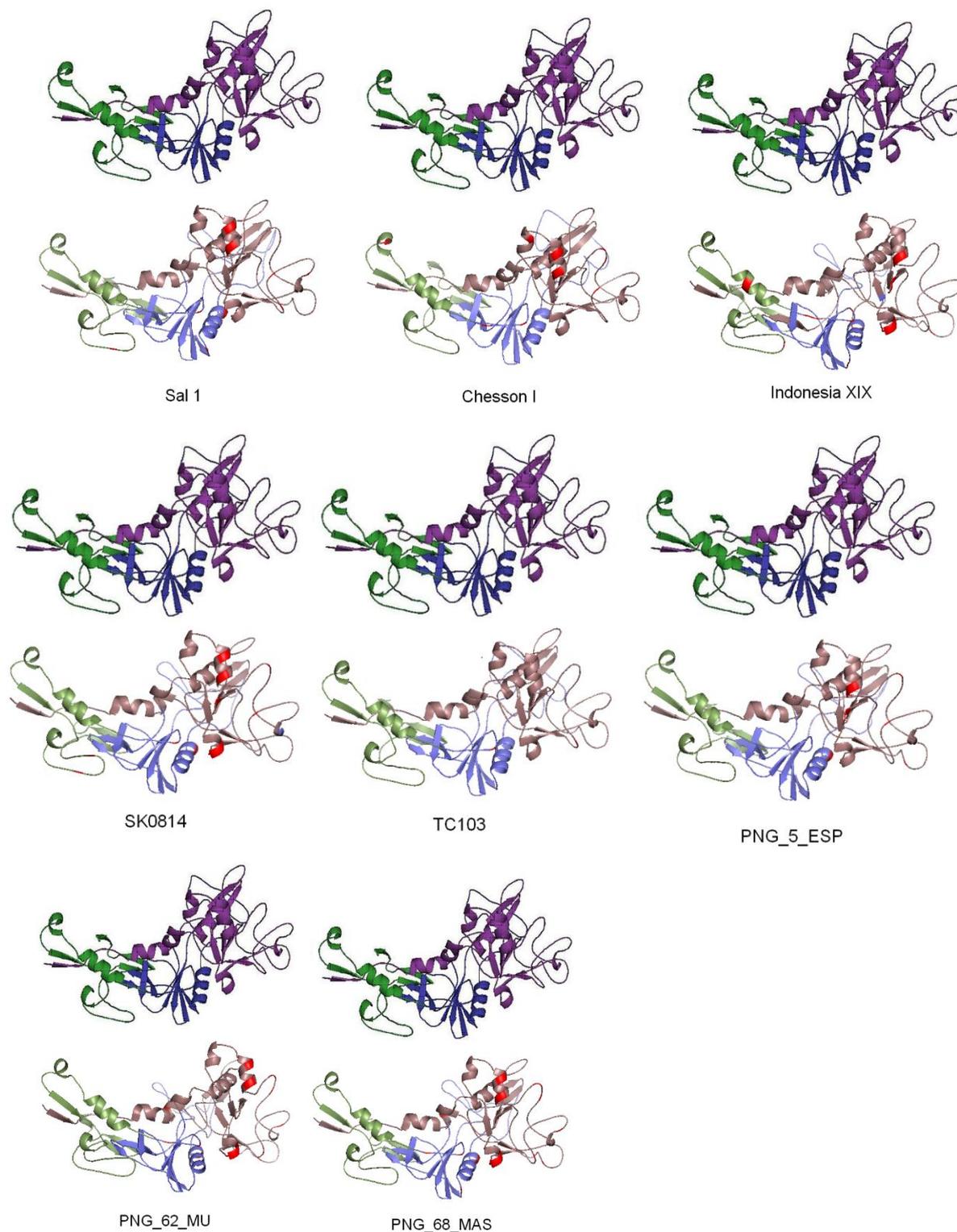


Figura 16. Estruturas das 8 variantes expressas da proteína PvAMA-1, originadas em software de estruturação molecular: As cores representam os três diferentes domínios característicos da PvAMA-1, sendo a cor rosa representante do Domínio I, a cor azul representante do Domínio II e a cor verde representante do Domínio III. As estruturas foram feitas através do software PyMOL®, utilizando como base a sequência de aminoácidos do banco de dados GenBank™ e a definição de domínios previamente realizada (PIZARRO et al., 2005). Em vermelho, as regiões com aminoácidos que diferem do alelo Belem, que está representado acima de cada uma das estruturas, para efeito comparativo.

4.4 Comparação da resposta de anticorpos IgG contra as variantes de PvAMA-1 em indivíduos expostos à malária

Com o objetivo de avaliar comparativamente o reconhecimento das variantes de PvAMA-1, 611 amostras de área endêmica do Estado do Pará foram testadas por ELISA, inicialmente apenas contra a variante Belem na placa. Para isso, os soros foram separados em dois grupos: i) pacientes não infectados no momento da coleta do soro e ii) pacientes infectados por *P. vivax* no momento da coleta. Para classificar um paciente como infectado ou não infectado, foi realizado o teste de gota espessa no momento da realização da coleta da amostra. Os dados foram documentados em Termo de Consentimento Individual (anexo III).

A prevalência de respondedores entre indivíduos infectados e não infectados está apresentada na Figura 17A, a qual demonstra que a porcentagem de amostras positivas no grupo de pacientes infectados é significativamente maior do que em pacientes não infectados (80,77 e 46,32%, respectivamente), (teste χ^2 , $p < 0,0001$). Além disso, o índice de reatividade em indivíduos infectados é significativamente mais alto do que em indivíduos não infectados (teste de *Kruskal-Wallis*, $p = 0.337$). A comparação entre infectados e não infectados que apresentaram casos anteriores e aqueles indivíduos que já foram infectados anteriormente pode ser consultada na Figura 17B. Na mesma figura, verificamos que não há diferença estatística nos valores de IR entre os infectados que apresentaram episódios prévios e os que não tiveram episódios anteriores (teste *Kruskal-Wallis*, $p > 0.05$). Já os indivíduos não infectados no momento da coleta apresentam uma diferença significativa (teste *Kruskal-Wallis*, $p < 0,0001$) entre os que não apresentaram e os que apresentaram episódios anteriores da doença.

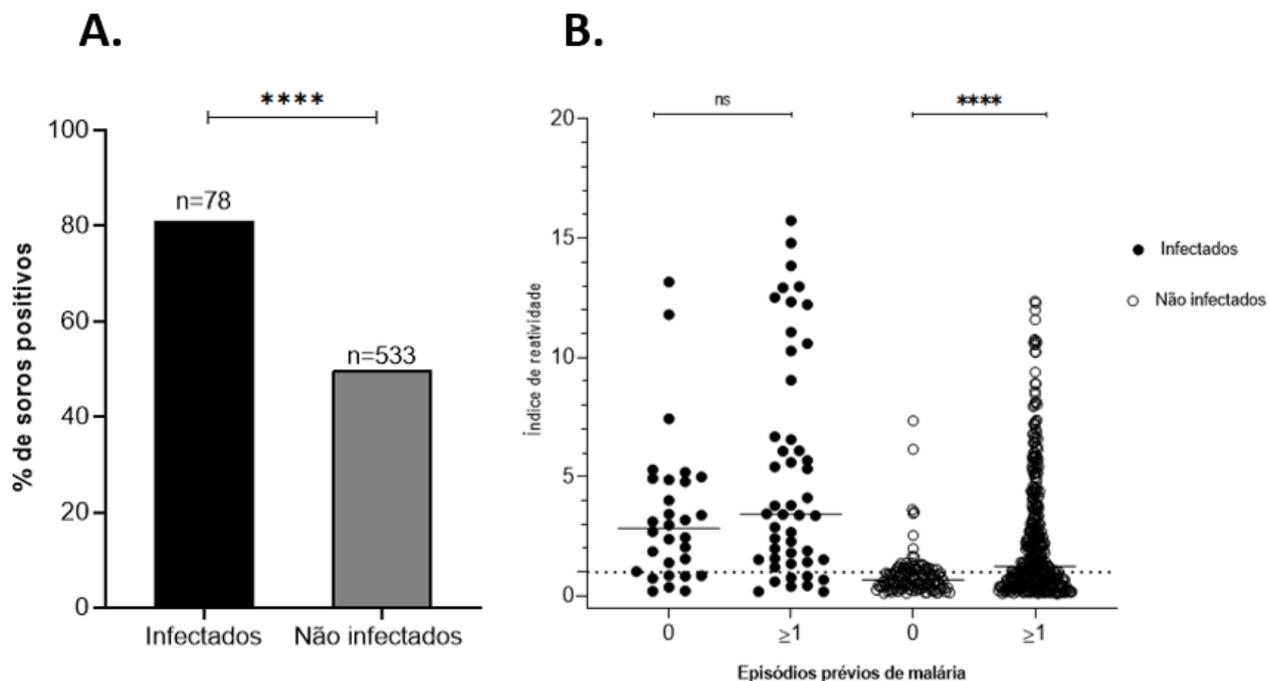


Figura 17. Comparação da resposta de anticorpos IgG contra a proteína recombinante PvAMA-1 Belem em indivíduos expostos à malária, infectados e não infectados. A. As 611 amostras foram agrupadas em: i) indivíduos infectados no momento da coleta (n=78) e ii) indivíduos não infectados no momento da coleta (n=533). As amostras foram analisadas por ELISA quanto à presença de anticorpos IgG contra a proteína PvAMA-1 Belem. O diagnóstico dos indivíduos infectados foi realizado pela técnica de gota espessa no momento da coleta. Todas as amostras foram testadas 1:100 em duplicata. Para cálculo do *cutoff* (=0,125), foram utilizados 20 soros de indivíduos da cidade de São Paulo, que nunca foram expostos à malária. B. Índice de reatividade entre os indivíduos agrupados por número de episódios prévios de malária. O índice de reatividade foi calculado individualmente, dividindo o valor de DO_{492} pelo valor do *cutoff*. As linhas horizontais pretas sobre os símbolos indicam a mediana com intervalo de 95% de confiança. A linha pontilhada indica o valor 1, correspondente ao valor mínimo de IR positivo. **** $p < 0,0001$, teste Kruskal-Wallis.

A fim de comparar a magnitude dos anticorpos para as demais variantes, soros de 100 pacientes sorologicamente positivos para PvAMA-1 Belem com DO_{492} entre 0,8 e 1,2, foram testados por ELISA. Quando classificados por intensidade de resposta de anticorpos para a variante de referência, medida por DO_{492} , é possível identificar que muitos pacientes que respondem com alta intensidade para Belem, respondem de forma semelhante (faixa de DO_{492} acima de 0,8) para as variantes Sal-1, Chesson I e SK0814. Por outro lado, níveis mais baixos de DO_{492} , foram obtidos contra as variantes Indonésia XIX, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS (Figura 18A).

Com o objetivo de avaliar se um mesmo indivíduo altamente respondedor (DO_{492}

$>0,8$) para uma das variantes é também respondedor para uma ou mais das outras, a correlação entre as amostras foi calculada seguindo o coeficiente de correlação de Spearman, que tem 1.0 como valor máximo. A Figura 18B mostra que os maiores valores

de correlação foram obtidos entre as variantes PNG_05_ESP x PNG_62_MU e PNG_62_MU x PNG_68_MAS ($r=0,56$, em todos os casos). Valores ainda expressivos foram obtidos entre PNG_05_ESP x PNG_68_MAS ($r=0,49$).

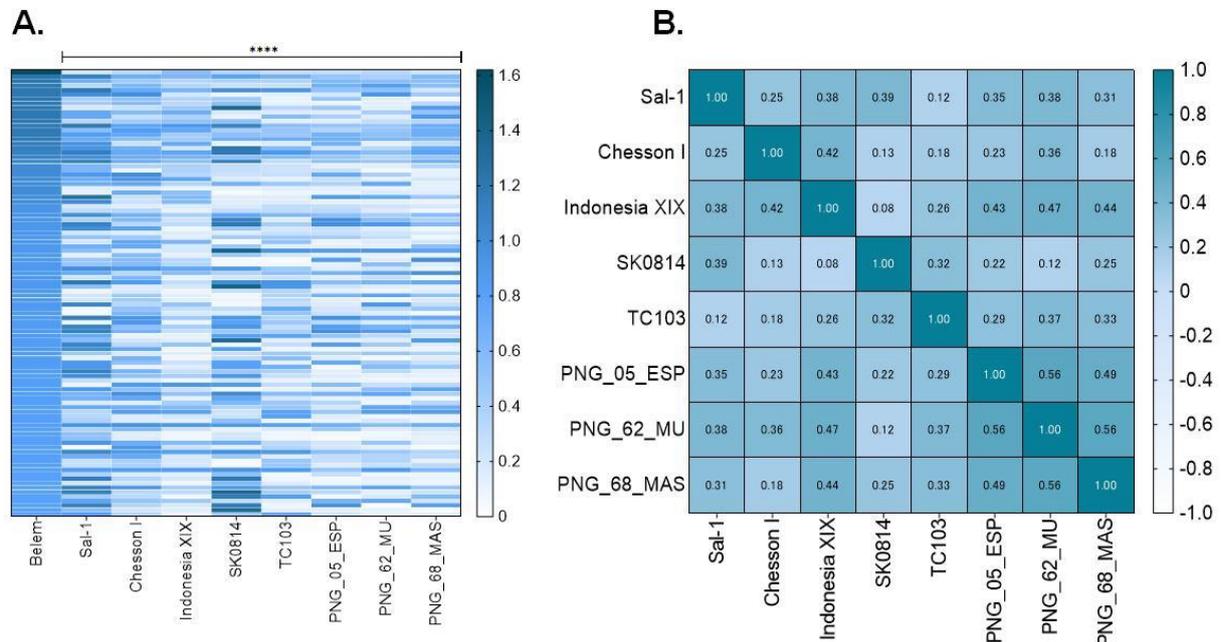


Figura 18. Comparação da resposta de anticorpos IgG contra as diferentes variantes em indivíduos expostos a malária. A. Heatmap de magnitude de anticorpos IgG em amostras de 100 indivíduos sorologicamente positivos para a proteína PvAMA-1 Belem, em comparação com as demais variantes. 100 pacientes que apresentaram valor de DO₄₉₂ na faixa de 0,8 a 1,2 para PvAMA-1 foram testados para as outras variantes Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS. Os valores de corte foram calculados com base em 20 indivíduos de São Paulo nunca expostos à malária, sendo respectivamente: 0,120, 0,120, 0,127, 0,091, 0,133, 0,120, 0,090, 0,082 e 0,077, respectivamente. As linhas representam as amostras na ordem dos testes, enquanto as colunas são representativas de cada variante de proteína. Quanto mais próximo o valor de DO₄₉₂ de 1,5, mais escura a nuance no gráfico. **** $p < 0,0001$, Teste de Kruskal-Wallis **B. Correlação entre as respostas para as variantes (exceto Belém) medida por IR, entre os indivíduos sorologicamente positivos para a proteína PvAMA-1 Belem.** Os índices de correlação de Spearman (r) variam de 0,0 a 1,0. Cada linha e coluna corresponde a uma proteína recombinante na ordem acima mencionada, com o ponto de interseção entre a linha e a coluna representando o índice de correlação entre ambas (quanto mais escuro, mais próximo de 1,0). Todas as amostras foram testadas ao mesmo tempo para as 8 variantes, na diluição de 1:100, em duplicata.

Para verificar se soros de indivíduos sorologicamente negativos para PvAMA-1 Belem podem têm anticorpos capazes de reconhecer pelo menos uma das outras formas alélicas, 50 amostras de indivíduos não respondedores para PvAMA-1 Belem foram testadas contra as demais variantes. O perfil de resposta dos anticorpos destes indivíduos foi menos intenso do que o encontrado nos pacientes sorologicamente positivos para Belem, uma vez que a maior parte dos valores de DO₄₉₂ ficou entre 0,6 e 0,8 (Figura 19A). Analisando a correlação entre a intensidade das respostas seguindo novamente o coeficiente de

correlação de *Spearman* (Figura 19B), nota-se que muitos indivíduos (não respondedores para Belem) respondem em sua maioria (78%), para as demais variantes; também é possível observar que quando há resposta para pelo menos uma das variantes, o mesmo indivíduo responde com intensidade similar para as demais. O maior valor obtido na análise de correlação foi 0.92, entre Sal 1 e SK0814 e entre TC103 e PNG_62_MU. O menor valor foi 0.38, na correlação entre Chesson I e PNG_62_MU. Os demais valores, mais baixos (0.59, 0.67, 0.65 e 0.59) foram encontrados para a variante PNG_68_MAS em correlação com Sal 1, Chesson I, SK0814, TC103 e PNG_62_MU. Assim, o *heatmap* de correlação ilustra os valores em sua maioria próximos do máximo ($r=1.0$). Valores mais baixos (0.59, 0.38, 0.67, 0.65 e 0.59) foram encontrados para a variante PNG_68_MAS em correlação com Sal-1, Chesson I, SK0814, TC103 e PNG_62_MAS, nesta ordem

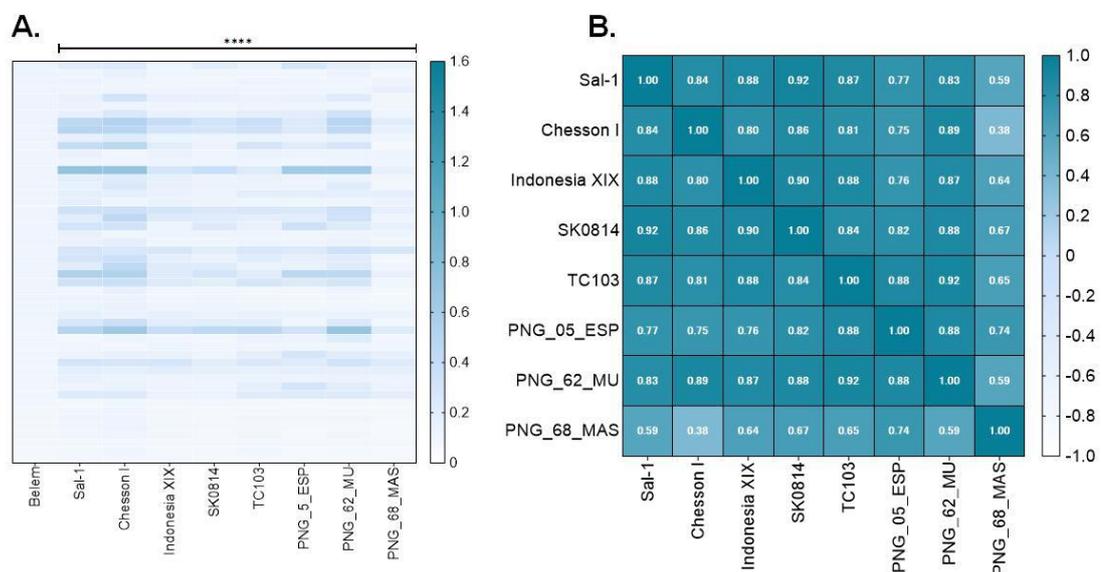


Figura 19. Perfil da resposta de anticorpos contra as variantes. A. Heatmap de magnitude de anticorpos IgG em 50 amostras de indivíduos sorologicamente negativos para a proteína PvAMA-1 Belem, em comparação com as demais variantes. 50 pacientes não respondedores para a variante PvAMA-1 Belem foram testados para as variantes Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS. Os valores de *cutoff* foram calculados com base em 20 indivíduos de São Paulo que nunca foram expostos à malária, sendo respectivamente: 0,120, 0,120, 0,177, 0,091, 0,133, 0,120, 0,090, 0,082 e 0,077. As linhas representam as amostras na ordem dos testes, enquanto as colunas são representativas de cada variante da proteína. Quanto mais próximo o valor de DO_{492} de 1,5, mais escuro a nuance no gráfico. ** $p < 0,0001$, teste Kruskal-Wallis. B. Correlação entre as respostas para as variantes (exceto Belém) medida por IR, entre os indivíduos sorologicamente negativos para a proteína PvAMA-1 Belem. Os índices de correlação de *Spearman* (r) variam de 0,0 a 1,0. Cada linha e coluna corresponde a uma proteína recombinante na ordem acima mencionada, com o ponto de intersecção entre a linha e a coluna representando o índice de correlação entre ambas (quanto mais escuro, mais próximo de 1,0). Todas as amostras foram testadas ao mesmo tempo para as 9 variantes, na diluição de 1:100 em duplicata.**

Quanto ao reconhecimento, a variante Belem é mais semelhante com Chesson I (97%) quando comparada com Sal 1 (72%). Já entre os negativos, os valores de prevalência variaram de 36% (PNG_68_MAS) a 72% (Sal-1).

Para verificar se os níveis de IgG entre positivos e negativos para Belem contra cada uma das variantes é diferente, pode-se observar a comparação dos índices de reatividade na Figura 20. Analisando os indivíduos respondedores para Belem em comparação as demais variantes, o menor índice de reatividade encontrado foi de 0.25 para Indonesia XIX, enquanto o maior valor de IR observado foi de 15,53 para SK0814. Já os indivíduos não respondedores para

Belem apresentaram valores entre 0.54, para PNG_05_ESP e 5.77, para Chesson I. Além disso, quando considerados os valores de mediana individualmente, todas as variantes apresentam valores significativamente maiores entre os indivíduos infectados, quando comparados aos não infectados e não infectados (Figura 20B).

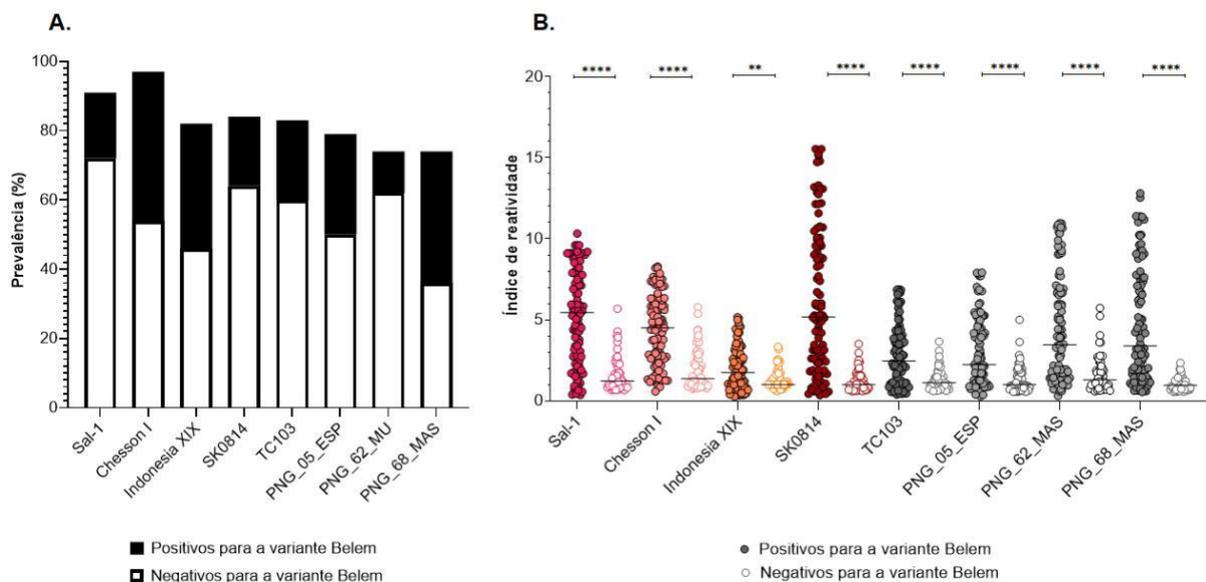


Figura 20. Valores de prevalência de anticorpos IgG e distribuição de valores do Índice de Reatividade individual encontrado para cada variante. A. Resposta contra as variantes estudadas em 150 indivíduos previamente testados para a cepa Belem. 150 amostras foram testadas para as demais variantes, contendo dois diferentes perfis de pacientes: i) positivos para Belem (n=100) e ii) negativos para Belem (n=50). Os valores de *cutoff* foram calculados com base em 20 indivíduos de São Paulo, que nunca foram expostos à malária. As placas de ELISA foram preparadas para cada uma das variantes em uma concentração de 4µg/mL. **B. Índice de Reatividade das demais variantes nos 150 pacientes.** Os índices de reatividade foram calculados individualmente, dividindo o número de DO pelo valor do *cutoff*. As linhas horizontais pretas sobre os símbolos indicam a mediana com intervalo de 95% de confiança. A linha pontilhada sobre os pontos do eixo y denotam o valor mínimo positivo do índice de reatividade (=1.0). Teste Kruskal-Wallis: **** p<0,0001 *** p<0,001 ** p<0,005 * p<0,05

4.5 Imunogenicidade da variante PvAMA-1 Belem em camundongos e análise da reatividade cruzada entre as diferentes variantes

Com o objetivo de verificar a imunogenicidade de PvAMA-1, analisamos o soro de camundongos imunizados previamente pelo grupo com a variante PvAMA-1 Belem. O reconhecimento das demais variantes por anticorpos anti-PvAMA-1 Belem é representado na Figura 21, e corrobora os experimentos de antigenicidade com soros humanos ao evidenciar o predomínio de reconhecimento das variantes Sal-1, Chesson I, Indonesia XIX, e SK0814. Os menores valores encontrados foram para as variantes PNG_68_MAS e PNG_62_MU, respectivamente.

Para verificar se existe reatividade cruzada entre as variantes estudadas, realizou-se o ensaio de competição entre os diferentes antígenos solúveis, descrito no item 3.12. As maiores porcentagens de inibição da ligação de anticorpos à proteína Belem (aderida à placa) foram encontradas para as variantes Chesson I (48,25%), Indonesia XIX (71,10%), SK0814 (72,80%) e Sal-1 (54,87%), enquanto as menores para TC103 (44,8%), PNG_05_ESP (26,35%), PNG_62_MU (12,74%) e PNG_68_MAS (33,17%). Assim, as variantes Chesson I, Indonesia XIX, SK0814 e Sal-1 foram predominantemente reconhecidas por anticorpos que reconhecem epítomos comuns ou de reatividade cruzada com a variante Belem. O controle positivo foi feito com soros incubados com a variante de referência (proteína homóloga), situação em que se verificou 93% de inibição de reconhecimento dos anticorpos.

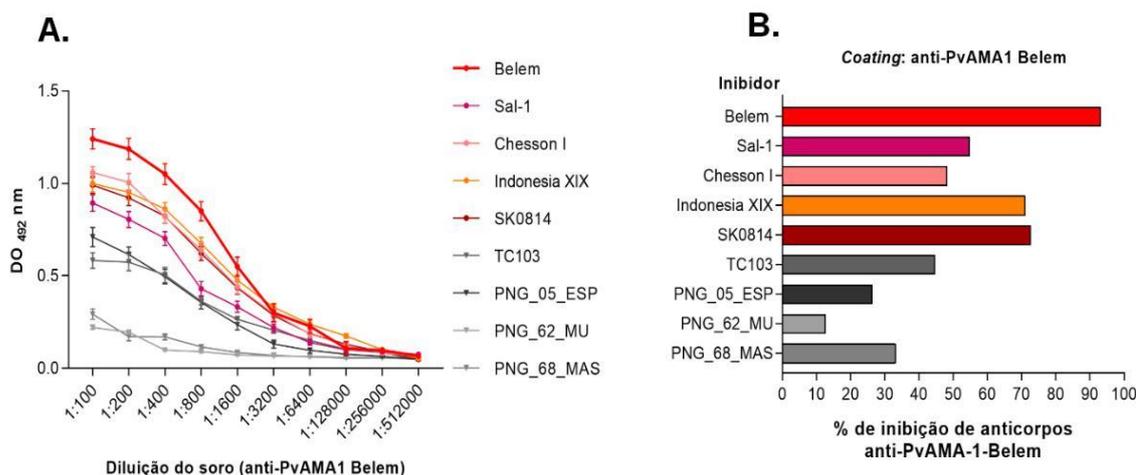


Figura 21. A. Reconhecimento das demais variantes por anticorpos anti-PvAMA-1 Belem. Os soros de camundongos foram analisados por ELISA quanto a anticorpos para PvAMA-1 Chesson I, Indonesia XIX, SK0814, Sal-1, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS. Todas as amostras foram testadas em duplicata e os resultados são expressos como a média aritmética dos valores de DO_{492} de anticorpos de cada animal diluídos a partir de 1:100. **B. Porcentagem de inibição de anticorpos anti-PvAMA-1 Belem pelas demais variantes, quando utilizadas como proteínas solúveis na placa.** A porcentagem foi calculada conforme descrito no item 3.12.

Considerando-se então os resultados de reatividade cruzada apresentados na Figura 21, três padrões diferentes de resposta inibitória foram observados: i) maior ou igual a 48%, portanto constituído de: Chesson I, Indonesia XIX, Sal-1 e SK0814. ii) menor do que 48%, portanto constituído de: TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS, além de iii) todas as variantes. Os resultados apresentados na Figura 22 demonstraram que o grupo contendo variantes que inibem menos os anticorpos anti-PvAMA-1 Belem apresenta uma maior porcentagem de resposta contra os antígenos (74,18%), além de demonstrarem que um mix de todas as variantes alélicas de menor inibição apresenta porcentagem de resposta mais baixa (28,6%).

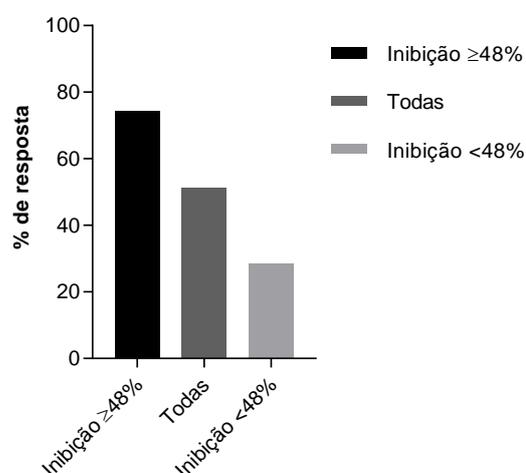


Figura 22. Porcentagem de resposta para as demais variantes em comparação com PvAMA-1 Belem. A sensibilização das placas foi realizada com 50 µg da variante PvAMA-1 Belem. Os grupos testados foram i) maior ou igual a 48%, portanto constituído de: Chesson I, Indonesia XIX, Sal-1 e SK0814. ii) menor do que 48%, portanto constituído de: TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS, além de iii) todas as variantes. O soro dos camundongos foi pré-incubado com cada uma das proteínas heterólogas na concentração final de 10 µg/mL, separadas nos três grupos descritos. A porcentagem de resposta foi calculada de acordo com o número de soros considerados positivos (acima de 0,125). O *cutoff* foi calculado com base em 20 indivíduos de São Paulo, nunca expostos à malária.

V. DISCUSSÃO

Apesar do número total de casos anuais de malária ter diminuído significativamente desde o ano 2000, anualmente mais de 200 milhões de novos episódios são documentados; a cada dois minutos, uma criança morre de malária no mundo. Além disso, alguns países como o Brasil e a Venezuela frequentemente integram a lista das áreas de alto risco, variando apenas quanto a intensidade de transmissão (WHO, 2019).

A fim de contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax*, uma das linhas de pesquisa do nosso grupo visa analisar aspectos da resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes, baseadas em antígenos de estágios assexuados sanguíneos do parasito. Neste contexto, diversos estudos já foram conduzidos para compreender melhor a resposta imune naturalmente adquirida contra PvAMA-1 em indivíduos de diferentes áreas endêmicas brasileiras – Pará (RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006; BARBEDO et al., 2007), Rondônia (SÁNCHEZ-ARCILA et al., 2015) e Amazonas (BARBEDO et al., 2007). Nestes trabalhos, foram obtidos resultados que sugeriram um alto potencial vacinal desta proteína: 85% dos soros de 200 indivíduos de área endêmica brasileira apresentaram anticorpos contra uma forma recombinante de PvAMA-1, caracterizando-a como altamente imunogênica em infecções naturais (RODRIGUES et al., 2004). Em 2008, Múfalo e colaboradores avaliaram o reconhecimento de anticorpos IgG para o ectodomínio completo da PvAMA-1, buscando identificar suas porções mais imunogênicas. As mesmas análises foram realizadas com proteínas recombinantes representantes dos diferentes domínios e combinações, definindo então as proteínas recombinantes que continham o Domínio II como mais imunogênicas (MÚFALO et al., 2008). Contudo, regiões de polimorfismo no Domínio foram localizadas; essas áreas poderiam trazer implicações na indução de resposta imune (PUTAPORNTIP et al., 2009; DIAS et al., 2011), uma vez que poderiam fornecer um mascaramento conformacional que protegeria o local de ligações de anticorpos do hospedeiro (MACRAILD et al., 2011). Então, com o sequenciamento de 263 sequências de ectodomínios de PvAMA-1, Arnott e colaboradores ressaltaram a já conhecida presença de polimorfismo no domínio I e a relação entre as ocorrências de polimorfismo e distribuição geográfica das diferentes variantes de AMA-1 (ARNOTT et al., 2013). Ademais, anticorpos policlonais anti-PvAMA-1 impediram o processo de reinvasão de reticulócitos por merozoítos em 4 isolados tailandeses, apresentando porcentagens de inibição entre 10.79% e 43.38%. Entretanto, foi observada uma diferença significativa na porcentagem de inibição (média \pm DP de inibição: 25.15% \pm 15.77%), o que poderia ser creditado a diversidade gênica do ectodomínio da PvAMA-1 (sequência de aminoácidos

baseada em um isolado brasileiro previamente utilizado por Rodrigues et al., 2005) (VICENTIN et al., 2014).

No presente trabalho, demos continuidade aos estudos envolvendo a PvAMA-1, considerando então esclarecer o impacto da diversidade gênica da proteína em seu potencial vacinal. Para tanto, utilizamos 9 variantes classificadas como representativas da diversidade gênica global da PvAMA-1, tendo como base o trabalho de Arnott et al. em 2013: i) representativa da América do Sul, a variante Belem; ii) de diferentes regiões asiáticas, Chesson I, Indonesia XIX, SK0814 e TC103; iii) da Papua Nova Guiné, três alelos foram descritos e selecionados para o presente trabalho, uma vez que apresentavam maior diversidade gênica entre si e as demais variantes de mesma origem geográfica: PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS. Para iniciar o estudo sobre o impacto da diversidade gênica na resposta imune contra PvAMA-1, a resposta de anticorpos contra estas nove variantes da PvAMA-1 foram avaliadas em indivíduos expostos à malária.

Para dar prosseguimento aos estudos com proteínas recombinantes, primeiramente o grupo realizou a comparação e utilização de diferentes sistemas de expressão. Bactérias *Escherichia coli* e, posteriormente, leveduras *Pichia pastoris* demonstraram rendimentos satisfatórios para a utilização das proteínas expressas em imunoenaios (VICENTIN et al., 2014; ROCHA et al., 2017). Neste trabalho, a expressão das variantes foi satisfatória e confirmada por ensaio de *Western blot*, apresentado na Figura 14. A predição molecular das variantes, realizada no *software* de estrutura molecular PyMol[®] (Figura 16), permite a observação de que a maior parte dos polimorfismos dos aminoácidos, em comparação à Belem, estão em dobramentos α -hélice. No entanto, é necessário levar em consideração que as condições externas encontradas pela proteína em seu estado nativo não são reproduzidas ou consideradas neste tipo de predição.

A Figura 9 e a Tabela 3 detalham quais as trocas de aminoácidos e a classe de cada um deles quando a comparação é feita entre a variante brasileira (PvAMA-1 Belem) e as demais. Novamente, é possível observar que a maior parte dos polimorfismos estão localizados no Domínio I. A variante asiática TC103 e todas as oriundas da Papua Nova Guiné não apresentam polimorfismos no Domínio III em relação à Belem, o que pode significar que a variedade de epítomos neste domínio não está relacionada com a origem geográfica das variantes.

Quando analisados os resultados do ensaio de *Western blot*, é possível confirmar que as variantes obtidas correspondem às selecionadas para estudo: anticorpos monoclonais reconheceram as variantes, e, portanto, apontaram a especificidade esperada de epítomos. Portanto, após expressão e purificação das proteínas, as variantes se mostraram adequadas para utilização nos imunoenaios.

Inicialmente, 611 amostras de soro de indivíduos foram testadas contra a variante PvAMA-1 Belem, selecionada como referência no presente estudo por tratar-se de um isolado brasileiro. A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra a variante foi de 53,68%, conforme observado na Figura 17. Entre os indivíduos que eram sorologicamente positivos para malária no momento da coleta, 80,77% apresentaram resposta detectável de anticorpos. Quando agrupados em indivíduos que nunca tiveram malária e indivíduos que tiveram pelo menos um episódio anterior, os dados concordam com os estudos de 2006, em que os títulos de anticorpos anti-PvAMA-1 aumentam ao longo das múltiplas exposições e há uma porcentagem de 59% de resposta na região de Belém, entre indivíduos saudáveis expostos (MORAIS et al., 2006), e com resultados recentes que apontam que células B de memória aumentam proporcionalmente ao número de exposições (SILVEIRA; DOMINGUEZ; SOARES, 2018; SOARES et al., 2019).

Em seguida, verificamos qual a magnitude dos anticorpos contra a variante brasileira PvAMA-1 Belem apresentada contra as demais variantes. Para isso, 100 amostras classificadas como positivas para Belem (com DO_{492} de valores entre 0,8 e 1,2) foram testadas por ELISA contra os demais alelos. Os valores mais expressivos de DO_{492} foram obtidos para as variantes Chesson I, SK0814 e Sal-1, o que sugere que epítomos comuns ou de reatividade cruzada foram reconhecidos. Os resultados também mostraram que muitos dos indivíduos que apresentam uma intensa resposta para Belem (valor de DO_{492} acima de 1,0) possuem uma resposta menos intensa (valor de DO_{492} abaixo de 0,8) para as demais variantes, conforme observado nas Figuras 18 e 19. Níveis mais baixos de DO_{492} foram obtidos para as demais variantes (Indonésia XIX, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS), o que pode significar que essas variantes são menos prevalentes ou não circulam no Brasil.

A correlação existente entre as oito variantes em indivíduos sorologicamente positivos para Belem foi calculada com base em 100 amostras com valores de DO_{492} para Belem entre 0,8 e 1,2, através do coeficiente de *Spearman*. Os maiores valores (acima de 0,4) foram encontrados entre as variantes de localização geográfica próxima (PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS). Assim, os dados corroboram a possibilidade de que, entre

as variantes, podem haver uma ou mais regiões distintas de epítomos e que a similaridade dessas regiões pode estar relacionada com a localização geográfica (ARNOTT et al., 2013). Além disso, tanto a análise da magnitude dos anticorpos nesses indivíduos quanto os baixos índices de correlação entre as variantes concordam com dados anteriores, que apontam que diferentes variantes da PvAMA-1 podem conter variadas conformações de antígenos (TERHEGGEN et al., 2014).

Para elucidar essa possibilidade, foram realizados ensaios com 50 indivíduos sorologicamente negativos para a variante PvAMA-1 Belem, avaliando a presença de anticorpos IgG para as demais variantes. Apesar de haver resposta para os outros alelos, a intensidade é mais baixa se comparada com os respondedores para Belem: em indivíduos sorologicamente positivos, a faixa de resposta ficou com os valores de DO_{492} , em sua maioria, entre 0,8 e 1,3, enquanto em indivíduos sorologicamente negativos os valores mais frequentes de DO_{492} têm início em 0,6. Utilizando o mesmo cálculo de correlação descrito para as 100 amostras anteriores, observa-se que as mesmas amostras altamente respondedoras (valor de DO_{492} acima de 1,0) para uma variante são também positivas (apresentando valores de DO_{492} entre 0,6 e 1,6) para as demais, uma vez que os índices de correlação são altos (entre 0,75 e 0,92) entre todas as variantes. Assim, tais resultados são congruentes com a observação de que a antigenicidade dos alelos não está sumariamente relacionada a sua origem geográfica (ARNOTT et al., 2013; TERHEGGEN et al., 2014).

Quando analisada a prevalência total das variantes nos 150 indivíduos, sendo 100 respondedores para Belem e 50 não respondedores, obtém-se porcentagens próximas (entre 70% e 81,2%) para Sal-1 9, Chesson I, Indonesia XIX, TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS, o que sustenta que a variedade antigênica dentre as variantes existe, mas pode não ser extensa (VULLIEZ-LE NORMAND et al., 2015). Ao analisar os valores de índice de reatividade individualmente, percebe-se valores maiores (menor e maior valor de mediana, respectivamente: 2 e 5,5) em indivíduos positivos para Belem, enquanto os indivíduos negativos para essa variante apresentam valores menores (menor e maior valor de mediana, respectivamente: 1 e 1,5).

Para verificar a resposta imune contra as variantes após imunização com uma delas, usamos soros de camundongos da linhagem C57BL/6 imunizados com PvAMA-1 Belem. A análise foi feita com base nos títulos de anticorpos IgG induzidos a partir do regime de imunização com três doses vacinais [contendo 10 μ g da proteína e 50 μ g do adjuvante Poly (I:C)], com intervalo de 21 dias entre cada dose. Dentre as variantes estudadas, as

variantes Chesson I, Sal-1, Indonesia XIX e SK0814 foram as mais reconhecidas por anticorpos anti-PvAMA-1 Belem. No entanto, o reconhecimento é menor para TC103 e as proteínas oriundas da Papua Nova Guiné, o que sugere uma variedade de epítomos relacionada com a origem geográfica das variantes.

Para então verificar se diferentes agrupamentos das variantes apresentam diferentes padrões de reconhecimento por anticorpos, foram feitos três diferentes grupos para os testes de ELISA de competição: o primeiro grupo constituído das variantes com maior reconhecimento (porcentagem de inibição $\geq 48\%$) entre os anticorpos anti-Belem: Chesson I, Sal-1, Indonesia XIX e SK0814; o segundo, das com menor reconhecimento (porcentagem de inibição $< 48\%$): TC103, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS; e o terceiro, contendo todas as variantes. Em 2012, Drew e colaboradores demonstraram que uma imunização com quatro diferentes alelos (W2Mef, 3D7, HB3 e FVO) da PfAMA-1 inibiu cerca de 80% das invasões do parasito em células sanguíneas de coelhos, maior porcentagem do que a oferecida por todos os alelos separadamente (DREW et al., 2012). No presente trabalho, os resultados observados sustentam a mesma abordagem para uma vacinação baseada na AMA-1 de *Plasmodium vivax*: o grupo com menor porcentagem de inibição de anticorpos anti-Belem apresentou reconhecimento próximo de 80% das demais variantes, enquanto o grupo com maior inibição respondeu para 30% e a mistura de todas as variantes ofereceu uma resposta de cerca de 50%, portanto menor do que o grupo contendo somente as variantes com menor inibição. Assim, os dados sugerem que uma vacina baseada na variante PvAMA-1 Belem gera anticorpos variante-transcendentes.

Para PfAMA-1, é sabido que a maior parte das regiões polimórficas estão no DI (ORD; TAMI; SUTHERLAND, 2008); para PvAMA-1, no entanto, também são reportadas regiões de polimorfismo também no Domínio II (ESCALANTE et al., 2001); um estudo realizado no Sri Lanka sugere que regiões deste domínio podem ser alvo de resposta imune protetora (GUNASEKERA et al., 2007). Neste trabalho, verificamos que a resposta imune contra variantes de diferentes configurações em ambos os domínios não apresentou um padrão geográfico, uma vez que as variantes oriundas de um mesmo continente apresentaram a indução de diferentes padrões de resposta imune. Isso pode estar relacionado com a ausência de uma análise de predisposição de epítomos ou ao elevado número de variantes do AMA-1 em todo o filo *Apicomplexa*.

Em conclusão, acreditamos que nosso estudo será de grande valia para estudos futuros da AMA-1 como candidato vacinal. Os resultados apresentados indicam o potencial

vacinal da AMA-1 de *P. vivax*, e traz novas informações sobre a efetividade de uma abordagem multi-alélica utilizando essa proteína como base em uma formulação vacinal: para uma vacina universal baseada em PvAMA-1, uma formulação multi-alélica incluindo variantes da Tailândia e Papua Nova Guiné deve ser testada.

VI. CONCLUSÕES

1. Entre 100 das amostras sorologicamente positivas para PvAMA-1 Belem, os maiores valores de DO₄₉₂ foram obtidos para as variantes Chesson I, SK0814 e Sal-1, sugerindo que epítomos comuns ou de reatividade cruzada são reconhecidos nessas variantes.
2. Nossos resultados demonstraram que estas mesmas variantes e a proteína homóloga foram predominantemente reconhecidas em soros policlonais de camundongos imunizados com PvAMA-1 Belem, sugerindo que as demais variantes são menos prevalentes (ou não circulam) no Brasil.
3. Estas mesmas variantes em fase solúvel foram capazes de inibir a ação de anticorpos à variante Belem aderida à placa, sugerindo a presença de epítomos comuns ou de reatividade cruzadas.
4. Uma formulação contendo variantes da Tailândia (TC103) e Papua Nova Guiné (PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_mas) deve ser testada, com o objetivo de aumentar a cobertura global da AMA-1 como componente vacinal.

VII. REFERÊNCIAS

A. MACRAILD, C. et al. Apical Membrane Antigen 1 as an Anti-Malarial Drug Target. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2039–2047, 1 ago. 2011.

AGNANDJI, S. T. et al. Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. **PLoS Medicine**, v. 11, n. 7, 2014.

ALEXANDRE, M. A. et al. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon.

Emerging Infectious Diseases, v. 16, n. 10, p. 1611–1614, 2010.

AMELIA, F. et al. Down-selecting circumsporozoite protein-based malaria vaccine: A comparison of malaria sporozoite challenge model. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 5, p. 1–9, 2019.

ANTHONY, M. P. et al. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. **Malaria Journal**, v. 11, 2012.

ARNOTT, A. et al. Global Population Structure of the Genes Encoding the Malaria Vaccine Candidate, Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA1). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, 2013.

BAI, T. et al. Structure of AMA1 from Plasmodium falciparum reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 36, p.12736–12741, 2005.

BAIRD, J. K. Neglect of Plasmodium vivax malaria. v. 23, n. 11, 2007.

BAIRD, J. K. et al. Diagnosis and Treatment of Plasmodium vivax Malaria. 2016.

BARBEDO, M. B. et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of Plasmodium vivax. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 335–339, 2007.

BARRY, A. **Malaria epidemiology: Insights from the genome of the malaria parasite**. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/malaria-epidemiology-insights-from-the-genome-of-the-malaria-parasite-1747-0862.1000015.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2020.

BEMVINDO DE PAULA, A. et al. **Infecção grave por Plasmodium vivax em indivíduo não residente de área endêmica: um relato de caso.** [s.l: s.n.].

BHATT, S. et al. The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015. 2015.

BILGO, E. et al. Improved efficacy of an arthropod toxin expressing fungus against mosquitoes. n. January, p. 3–10, 2017.

BINKA, F.; AKWEONGO, P. Prevention of Malaria Using ITNs: Potential for Achieving the Millennium Development Goals. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p. 261–267, 1 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1566-5240&volume=6&issue=2&spage=261>>. Acesso em: 7 nov. 2019.

BOES, A. et al. Detailed functional characterization of glycosylated and nonglycosylated variants of malaria vaccine candidate *Pf* AMA1 produced in *Nicotiana benthamiana* and analysis of growth inhibitory responses in rabbits. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 2, p. 222–234, fev. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12255>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, 1 out. 2017.

BRUCE-CHWATT, L. J. PALEOGENESIS AND PALEO-EPIDEMIOLOGY OF PRIMATE MALARIA. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 32, p. 363–387, 1965.

BUENO, L. L. et al. Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

CHANDA, E. et al. Amplification de la lutte intégrée contre les vecteurs du paludisme: Enseignements tirés de l'expérience du Malawi. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 6, p. 475–480, 1 jun. 2016.

CHAUDHURY, S. et al. Delayed fractional dose regimen of the RTS,S/AS01 malaria vaccine candidate enhances an IgG4 response that inhibits serum opsonophagocytosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

CHITNIS, C. E.; SHARMA, A. **Targeting the Plasmodium vivax Duffy-binding protein** *Trends in Parasitology*, jan. 2008. .

CHURCHER, T. S. et al. Probability of Transmission of Malaria from Mosquito to Human Is Regulated by Mosquito Parasite Density in Naïve and Vaccinated Hosts. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2017.

COLEY, A. M. et al. Structure of the Malaria Antigen AMA1 in Complex with a Growth-Inhibitory Antibody. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 9, p. e138, 2007. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030138>>. Acesso em: 21 jan. 2020.

COWMAN, A. F. et al. **Malaria: Biology and Disease** *Cell* Cell Press, , 20 out. 2016. .

DELGADILLO, R. F. et al. Stability of the Plasmodium falciparum AMA1-RON2 Complex Is Governed by the Domain II (DII) Loop. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 5 jan. 2016.

DEMBÉLÉ, L. et al. Persistence and activation of malaria hypnozoites in long-term primary hepatocyte cultures. v. 20, n. 3, 2014.

DIAS, S. et al. Evaluation of the genetic diversity of domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1) and the ensuing strain-specific immune responses in patients from Sri Lanka. **Vaccine**, v. 29, n. 43, p. 7491–7504, 6 out. 2011.

DIJANIC, C. et al. Case Report Relapsing Malaria: A Case Report of Primaquine Resistance. v. 2018, p. 10–13, 2018.

DONAHUE, C. G. et al. The Toxoplasma homolog of Plasmodium apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 15–30, 2000.

DOUGLAS, R. G. et al. Active migration and passive transport of malaria parasites.

Trends in Parasitology, p. 1–6, 2015.

DREW, D. R. et al. Defining the Antigenic Diversity of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 and the Requirements for a Multi-Allele Vaccine against Malaria. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

DUTTA, S. et al. Overcoming antigenic diversity by enhancing the immunogenicity of conserved epitopes on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003840, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385910>>. Acesso em: 15 out. 2019.

EBRAHIMZADEH, Z.; MUKHERJEE, A.; RICHARD, D. A map of the subcellular distribution of phosphoinositides in the erythrocytic cycle of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **International Journal for Parasitology**, 2017.

EDGAR, R. C.; DRIVE, R. M.; VALLEY, M. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

ESCALANTE, A. A. et al. Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 113, n. 2, p. 279–87, 6 abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295182>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

FRANÇA, T. C. C.; DOS SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Malária: Aspectos históricos e quimioterapia** *Quimica Nova* Sociedade Brasileira de Química, , 2008. .

GALIZI, R. et al. the control of the human malaria mosquito. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–8, 2014.

GENTIL, F. et al. A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6183–6190, 2010.

GENTON, B. et al. A Recombinant Blood-Stage Malaria Vaccine Reduces *Plasmodium falciparum* Density and Exerts Selective Pressure on Parasite Populations in a Phase 1–2b Trial in Papua New Guinea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 6, p. 820–827, 15 mar. 2002.

GENTON, B. et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: A prospective cohort study from Papua New Guinea.

PLoS Medicine, v. 5, n. 6, p. 0881–0889, 2008.

GRIFFING, S. M. et al. A historical perspective on malaria control in Brazil.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 110, n. 6, p. 701–718, 2015.

GUNASEKERA, A. M. et al. Genetic Diversity and Selection at the Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen-1 (PvAMA-1) Locus in a Sri Lankan Population. [s.d.] Disponível em: <www.proteinexplorer.org>. Acesso em: 1 mar. 2020.

GUTIERREZ, Y. The Rise and Fall of Malaria in Europe: A Historico-Epidemiological

Study. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 246, n. 10, p.

1133, 4 set. 1981. Disponível em:

<<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1981.0332010006704>

1>. Acesso em: 23 out. 2019.

GUTMAN, J. et al. Safety, tolerability, and efficacy of repeated doses of dihydroartemisinin-piperaquine for prevention and treatment of malaria: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 184–193, 1 fev. 2017.

HANOVER, J. W. PHYSIOLOGY OF TREE +6081 RESISTANCE TO INSECTS. n.

6142, 1975.

HEMINGWAY, J. et al. Averting a malaria disaster: Will insecticide resistance derail malaria control? **The Lancet**, v. 387, n. 10029, p. 1785–1788, 2016.

HISAEDA, H. et al. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of Plasmodium vivax to infect mosquitoes. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6618–23, dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083773>>. Acesso em: 2 jan. 2020.

HOPP, C. S. et al. Longitudinal analysis of Plasmodium sporozoite motility in the dermis reveals component of blood vessel recognition. p. 1–21, 2015.

HUPALO, D. N. et al. Population genomics studies identify signatures of global dispersal and drug resistance in *Plasmodium vivax*. v. 48, n. 8, p. 953–959, 2016.

JOY, D. A. et al. Early Origin and Recent Expansion of *Plasmodium falciparum*. v.

300, n. April, p. 318–322, 2003.

KÄLLANDER, K.; NSUNGWA-SABIITI, J.; PETERSON, S. Symptom overlap for malaria and pneumonia — policy implications for home management strategies. v. 90, p. 211–214, 2004.

KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 11, p. 1356–1362, 2011.

KARNAD, D. R. et al. Intensive care in severe malaria: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. **Journal of Critical Care**, v. 43, p. 356–360, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.11.007>>.

KENNEDY, M. C. et al. In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): Production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6948–6960, 2002.

KISINZA, W. N. et al. Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from Tanzania : a major concern for malaria vector control. **Malaria Journal**, p. 1–10, 2017.

LI, J. et al. Geographic Subdivision of the Range of the Malaria Parasite *Plasmodium vivax*. v. 7, n. 1, p. 35–42, 2001.

LIU, W. et al. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature Communications**, v. 5, 21 fev. 2014.

LO, E. et al. Selection and Utility of Single Nucleotide Polymorphism Markers to Reveal Fine-Scale Population Structure in Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, 26 set. 2018.

LÓPEZ, C. et al. **What is known about the immune response induced by Plasmodium vivax malaria vaccine candidates?** *Frontiers in Immunology* Frontiers Research Foundation, , 13 fev. 2017

MAIR, G. R. et al. NIH Public Access. v. 313, n. 5787, p. 667–669, 2007.

MALKIN, E. M. et al. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: A transmission blocking vaccine for Plasmodium vivax malaria. In: Vaccine, 24, **Anais...**Elsevier BV, 2 maio 2005.

MARINHO-E-SILVA, M. et al. Anophelines species and the receptivity and vulnerability to malaria transmission in the Pantanal wetlands, Central Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 113, n. 2, p. 87–95, 2018. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 24 out. 2019.

MARKUS, M. B. Do hypnozoites cause relapse in malaria? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 6, p. 239–245, 2015.

MESSENGER, L. A. et al. Insecticide resistance in Anopheles arabiensis from Ethiopia (2012 – 2016): a nationwide study for insecticide resistance monitoring. **Malaria Journal**, p. 1–14, 2017.

MITCHELL, G. H. et al. The effect of human immune IgG on the in vitro development of Plasmodium falciparum. **Parasitology**, v. 72, n. 2, p. 149–162, 1976.

MIURA, K. **Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines**Expert

Review of Vaccines, 2016.. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ierv20>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

MOON, R. W. et al. Normocyte-binding protein required for human erythrocyte invasion by the zoonotic malaria parasite Plasmodium knowlesi. p. 1–6, 2016.

MOORTHY, V. S.; REED, Z.; SMITH, P. G. MALVAC 2008: Measures of efficacy of malaria vaccines in phase 2b and phase 3 trials-Scientific, regulatory and public health perspectives. In: Vaccine, 5, **Anais...**29 jan. 2009.

MORAIS, C. G. et al. **ANTIBODIES TO PLASMODIUM VIVAX APICAL MEMBRANE ANTIGEN 1: PERSISTENCE AND CORRELATION WITH MALARIA TRANSMISSION INTENSITY**. [s.l: s.n.].

MUELLER, I. et al. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. **Advances in parasitology**, v.81, p. 77–131, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384622>>. Acesso em: 31 out. 2019.

MÚFALO, B. C. et al. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12–13, p. 1266–1273, 2008.

NEDAEI, F. et al. Analysis of *plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-

1) haplotypes among Iranian isolates. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 6, n. 4, 2017.

NIKOLAEVA, D.; DRAPER, S. J.; BISWAS, S. **Toward the development of effective transmission-blocking vaccines for malaria** *Expert Review of Vaccines* Expert Reviews Ltd., , 1 maio 2015. .

OKELL, L. C.; CHURCHER, T. S. Comment Generating the evidence base for malaria elimination: the situation in Haiti. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X>>. Acesso em: 7 nov. 2019.

ORD, R. L.; TAMI, A.; SUTHERLAND, C. J. *ama1* genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, 10 out. 2008.

OUATTARA, A. et al. Extent and Dynamics of Polymorphism in the Malaria Vaccine Candidate *Plasmodium falciparum* Reticulocyte-Binding Protein Homologue-5 in Kalifabougou, Mali. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 1, p. 43–50, 2018.

PALACPAC, N. M. Q. et al. Phase 1b Randomized Trial and Follow-Up Study in Uganda of the Blood-Stage Malaria Vaccine Candidate BK-SE36. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e77073, 28 maio 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0077073>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

PAYNE, R. O. et al. Human vaccination against RH5 induces neutralizing antimalarial antibodies that inhibit RH5 invasion complex interactions. **JCI Insight**, v. 2, n. 21, 2 nov. 2017.

PHILLIPS, M. A. et al. A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 296, 15 jul. 2015.

PIRES, C. V. et al. Blood-stage Plasmodium vivax antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2018.

PIZARRO, J. C. et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 408–411, 2005.

PRICE, R. N.; NOSTEN, F. **Single-dose radical cure of Plasmodium vivax: A step closer**The LancetLancet Publishing Group, , 2014. .

PRUGNOLLE, F. et al. African monkeys are infected by Plasmodium falciparum nonhuman primate-specific strains. 2011.

PUTAPORNTIP, C. et al. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of Plasmodium vivax in Thailand. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1295–1300, dez. 2009.

QUANG, N. D. et al. Polymorphism at the apical membrane antigen 1 gene (AMA1) of the malaria parasite plasmodium falciparum in a Vietnamese population. **Biochemical Genetics**, v. 47, n. 5–6, p. 370–383, jun. 2009.

RAMJANEE, S. et al. The use of transgenic Plasmodium berghei expressing the Plasmodium vivax antigen P25 to determine the transmission-blocking activity of sera from malaria vaccine trials. **Vaccine**, v. 25, n. 5, p. 886–894, 15 jan. 2007.

REMARQUE, E. J. et al. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 74–84, 2008a.

REMARQUE, E. J. et al. A diversity-covering approach to immunization with Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 induces broader allelic recognition and growth inhibition responses in rabbits. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2660–2670, jun. 2008b.

RICHIE, T. L.; SAUL, A. malaria vaccines. v. 415, n. February, p. 1–8, 2002.

RIVERA, F. D. L. et al. Type I Interferons Regulate Immune Responses in Humans with Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Article Type I Interferons Regulate Immune Responses in Humans with Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infection. **CellReports**, v. 17, n. 2, p. 399–412, 2016.

ROCAMORA, F. et al. Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. 2018.

ROCHA, M. V. et al. Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP119. **Vaccine**, v. 35, n. 18, p. 2463–2472, 25 abr. 2017.

RODRIGUES, M. H. et al. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malaria Journal**, v. 2, n. 1, p. 39, 2003.

RODRIGUES, M. H. C. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 185–192, 2004.

ROSAS, A. et al. Insecticide Resistance in Areas Under Investigation by the International Centers of Excellence for Malaria Research: A Challenge for Malaria Control and Elimination. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3_Suppl, p. 69–78, 2015. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.14-0844>>.

SALAMANCA, D. R. et al. **Plasmodium falciparum Blood Stage Antimalarial Vaccines: An Analysis of Ongoing Clinical Trials and New Perspectives Related to Synthetic Vaccines** **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 3 dez.2019.

SALGADO-MEJIAS, P. et al. Structure of Rhoptry Neck Protein 2 is essential for the interaction in vitro with Apical Membrane Antigen 1 in *Plasmodium vivax*. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, 25 jan. 2019.

SÁNCHEZ-ARCILA, J. C. et al. The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax*-specific antibody responses to MSP-119 and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2015.

SANDERS, P. R. et al. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 40169–40176, 2 dez. 2005.

SCHLAGENHAUF, P. **Malaria: From prehistory to present** *Infectious Disease Clinics of North America* W.B. Saunders, , 2004. .

SCHMIDT, N. W.; BUTLER, N. S.; HARTY, J. T. CD8 T cell immunity to *Plasmodium* permits generation of protective antibodies after repeated sporozoite challenge. **Vaccine**, v. 27, n. 44, p. 6103–6106, 19 out. 2009.

SILVEIRA, E. L. V.; DOMINGUEZ, M. R.; SOARES, I. S. **To B or Not to B:**

Understanding B Cell Responses in the Development of Malaria Infection *Frontiers in immunology* NLM (Medline), , 2018. .

SINGH, G.; DWIVEDI, S. K.; NATH, R. Mechanism of Resistance for Field Insects in Bt Crops and its Management. v. 34, n. 2, p. 152–154, 2018.

SIRAWARAPORN, W. et al. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1124–1129, 18 fev. 1997.

SIRIMA, S. B.; COUSENS, S.; DRUILHE, P. Protection against Malaria by MSP3

Candidate Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 11, p. 1062–

1077, 15 set. 2011. Disponível em:

<<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMc1100670>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

SNOW, R. W. et al. Estimating mortality , morbidity and disability due to malaria among Africa ' s non-pregnant population. n. 0029, 1999.

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

SOULARD, V. et al. Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice. **Nature Communications**, v. 6, n. May, 2015.

SPRING, M. D. et al. Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 23 abr. 2009.

SULEMAN, S. et al. Author's Accepted Manuscript. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.

SUN, P. et al. Protective Immunity Induced with Malaria Vaccine, RTS,S, Is Linked to Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein-Specific CD4 + and CD8 + T Cells Producing IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6961–6967, 15 dez. 2003.

TANGPUKDEE, N. et al. Malaria Diagnosis: A Brief Review. v. 47, n. 2, p. 93–102, 2009.

TEO, A. et al. **Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria** *Trends in Parasitology* Elsevier Ltd, 1 nov. 2016.

TERHEGGEN, U. et al. Limited antigenic diversity of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 supports the development of effective multi-allele vaccines. **BMC Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2014.

THERA, M. A. et al. A Field Trial to Assess a Blood-Stage Malaria Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 11, p. 1004–1013, 15 set. 2011. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1008115>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

TRIGLIA, T. et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 706–718, 2000.

URUSOVA, D. et al. Structural basis for neutralization of Plasmodium vivax by naturally acquired human antibodies that target DBP. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1486–1496, set. 2019.

VA, R. IDCases Severe malaria in immigrant haematological patient. v. 2, p. 77–79, 2015.

VICENTIN, E. C. et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 expressed in Pichia pastoris yeast. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1296–1307, 2014.

VULLIEZ-LE NORMAND, B. et al. Structural and Functional Insights into the Malaria Parasite Moving Junction Complex. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002755, 21 jun. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002755>>. Acesso em: 21 jan. 2020.

VULLIEZ-LE NORMAND, B. et al. Crystal structure of Plasmodium knowlesi apical membrane antigen 1 and its complex with an invasion-inhibitory monoclonal antibody. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 17 abr. 2015.

WHITE, M. T. et al. The Relationship between RTS,S Vaccine-Induced Antibodies, CD4+ T Cell Responses and Protection against Plasmodium falciparum Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 16 abr. 2013.

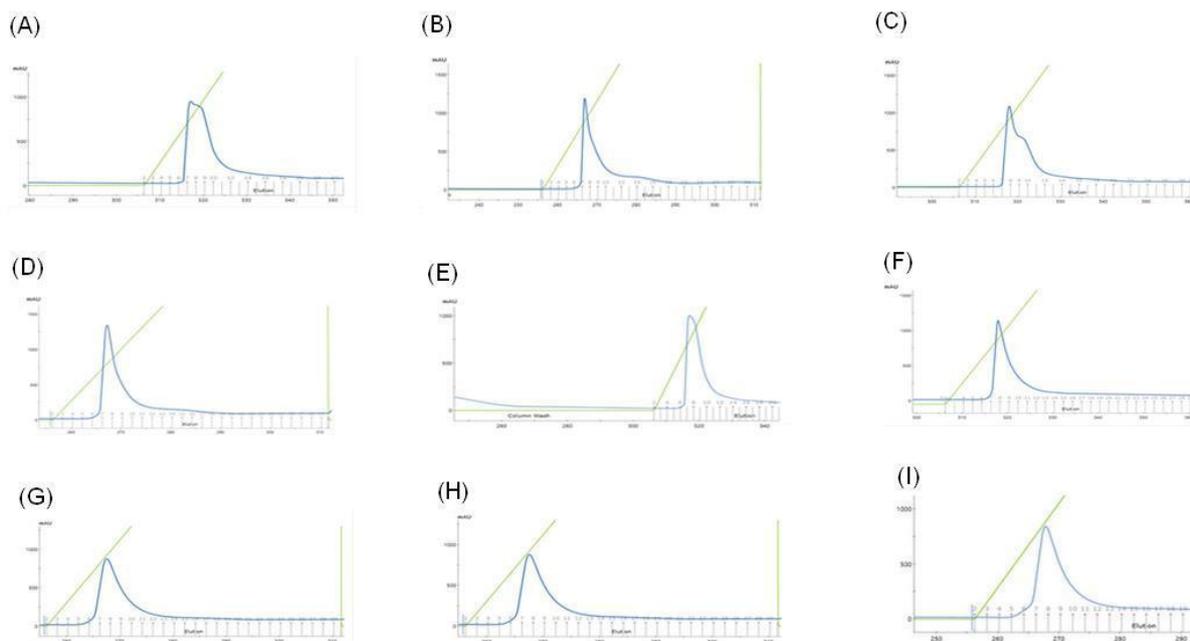
WHITE, M. T. et al. Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: Secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1450–1458, 1 dez. 2015.

WORLD MALARIA REPORT 2018 ISBN 978 92 4 156565 3. [s.l: s.n.]

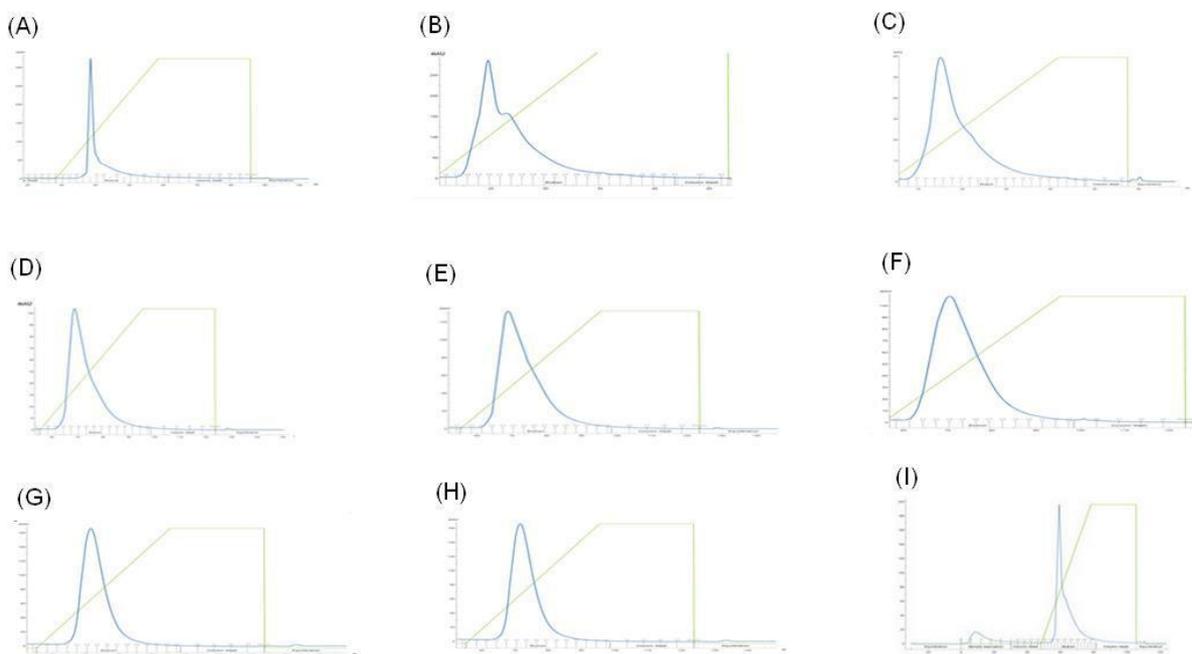
YUSUF, Y. et al. A viral-vectored multi-stage malaria vaccine regimen with protective and transmission-blocking efficacies. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. OCT, 2019.

ZHANG, M. et al. UIS2 : A Unique Phosphatase Required for the Development of Plasmodium Liver Stages. p. 1–20, 2016.

ZHENG, J. et al. Review Article Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2019/9751471>>. Acesso em: 7 nov. 2019.



Anexo I. Cromatogramas representativos da etapa de cromatografia por afinidade. O pico obtido para as variantes Belem, Chesson I, Indonesia XIX, Sal-1, SK0814, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS foram respectivamente (em mAu): 1.000, 1.400, 1.500, 1.400, 1.400, 1.300, 900, 1.600 e 900; a partir das respectivas porcentagens de 26%, 25%, 25%, 25%, 25%, 26%, 27%, 25%, e 26% de solução de eluição.



Anexo II. Cromatogramas representativos da etapa de cromatografia por troca iônica. O pico obtido para as variantes Belem, Chesson I, Indonesia XIX, Sal-1, SK0814, PNG_05_ESP, PNG_62_MU e PNG_68_MAS foram respectivamente (em mAu): 330, 275, 60, 125, 125, 120, 170, 110 e 180; a partir das respectivas porcentagens de 31%, 25%, 25%, 30%, 30%, 32%, 30%, 32%, e 27% de solução de eluição.

REDE PARAENSE DE MALÁRIA
PROCESSO CNPQ 555654/2009-5

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – resolução nº 196 de 10.10.1996 – CNS)

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME (PACIENTE): _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____
ENDEREÇO COMPLETO: _____
BAIRRO: _____ CEP: _____ CIDADE: _____
ESTADO: _____ TELEFONE: _____

II – DADOS SOBRE O ESTUDO

1. Título: Rede Paraense de Malária
2. Coordenadora: Dra. Marinete Marins Póvoa.

III. EXPLICAÇÕES SOBRE O PROJETO DE PESQUISA AO PACIENTE

1. A malária é uma doença muito freqüente na Amazônia, causada por parasitos chamados plasmódios.

2. A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza como ferramentas essenciais para o controle da malária, o diagnóstico laboratorial rápido e correto e o tratamento específico, adequado e eficiente para interrupção da transmissão. O Brasil vem seguindo essas orientações, e como o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) acompanha direta e diariamente e avalia em reuniões nacionais, no mínimo, duas vezes ao ano, a situação de malária em nosso país; e discute todas as atividades executadas pelos estados e tem sido detectado que essas orientações não estão sendo totalmente efetivas no nosso caso.

No Estado do Pará, embora o número de casos esteja decrescendo anualmente, observa-se que a ocorrência da malária está relacionada aos acampamentos ou assentamentos, o que é o caso do município de Goianésia do Pará, área de estudo desta Rede.

3. Para entendimento da situação de malária neste município a Rede Paraense de Malária propõe diferentes estudos nas áreas de Pesquisa Clínica, Caracterização molecular das populações de parasitos circulantes nos hospedeiros vertebrados e no vetor, e, Epidemiologia e Controle da Malária. Desta forma, espera-se poder contribuir para o controle desta endemia neste município.

4. Para conduzir estes estudos, precisaremos realizar coleta do sangue da ponta dos dedos para preparação de lâminas de Gota Espessa (GE) para diagnóstico da doença. Após a confirmação do diagnóstico de malária serão também coletados em sistema à vácuo de 10 a 15 mL de sangue de cada indivíduo, divididos em tubo sem anticoagulante e em tubo contendo anticoagulante (EDTA), que serão utilizados para obtenção do soro e do DNA, respectivamente. As amostras de soro serão mantidas a -20°C até o momento da realização dos testes para detecção de citocinas e anticorpos. O DNA obtido será utilizado para a realização de PCR em tempo real, investigação dos polimorfismos genéticos do hospedeiro e genotipagem do parasito. As coletas de sangue serão realizadas com materiais descartáveis e estéreis. Geralmente não há dor no local da coleta, mas pode ocorrer de intensidade limitada, e por pouco tempo, em casos de coletas de sangue da veia.

5. Algumas complicações decorrentes da coleta de sangue podem ocorrer como manchas roxas no local da coleta devido à retirada da agulha pelo profissional antes do garrote ou por perfuração da veia; alergia ao álcool iodado usada para limpeza local ou contaminações devido à má limpeza feita ou uso de material não-descartável (estéril) contaminado.

6. É assegurado o diagnóstico e o tratamento de todos os pacientes com malária, independente da participação neste estudo.

7. A sua participação neste estudo é voluntária e você poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento regular.

8. Para obtenção de quaisquer informações e esclarecimentos, o paciente poderá entrar em contato com Marinete Marins Póvoa no Instituto Evandro Chagas, situado na Rodovia Br 316, s/ nº - Bairro: Levilândia, CEP: 67030 – 000. Telefone para contacto: (0XX91) 3214- 2148 ou 8883 - 4887. Poderá também contactar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas, situado na Rodovia Br 316, s/ nº - Bairro: Levilândia, CEP: 67030 – 000. Telefone para contacto: (0XX91) 3214- 2237, sobre a Coordenação de Manoel do Carmo Pereira Soares.

9. Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo.

IV. AFIRMAÇÕES DO PACIENTE OU DE SEU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Fui esclarecido sobre os objetivos da pesquisa, os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos?

SIM NÃO

2. Fui esclarecido sobre a liberdade de tirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento ou do menor do qual sou responsável?

SIM NÃO

3. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo?

SIM NÃO

4. Fui esclarecido de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão?

SIM NÃO

5. Fui esclarecido sobre a segurança da minha identidade ou do menor do qual sou responsável será preservada, mantendo-se as informações em caráter confidencial.

SIM NÃO

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme acima definido, autorizo a minha participação ou do menor do qual sou responsável, na qualidade de paciente no Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Goianésia do Pará, de de,

.....
Assinatura do paciente ou do Responsável Legal

.....
Assinatura e carimbo do Pesquisador

Anexo III. Termo de Consentimento Individual. Fornecido pela Universidade Federal do Pará aos pacientes no momento da coleta